

Aus dem Institut für Pathologie
der Medizinischen Fakultät Charité
der Humboldt-Universität zu Berlin

DISSERTATION

Einfluß des Cyclooxygenase-2-Inhibitors NS-398 auf Proliferation und Apoptose von Ovarialkarzinomzelllinien

Zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät Charité
der Humboldt-Universität zu Berlin

von Antje Fürstenberg
aus Rathenow

Dekan: Prof. Dr. Joachim W. Dudenhausen

Gutachter: 1. Prof. Dr. Steffen Hauptmann
 2. Prof. Dr. Peter Dall
 3. Prof. Dr. Sigurd Lax

Datum der Promotion: 10.05.2004

Inhaltsverzeichnis

Abstract	5
1 Einleitung	6
1.1 Das klassische Target der NSAIDs: Die Cyclooxygenase	7
1.1.1 Die physiologische Rolle der Cyclooxygenase	7
1.1.2 Die Prostaglandine	9
1.1.3 Die Isoformen der Cyclooxygenase	10
1.1.4 Inhibitoren der COX-1 und COX-2 - selektive COX-Hemmer	11
1.1.5 COX-2-Expression und Malignität	12
1.1.6 Erklärungsmodelle zu den tumorigenen Eigenschaften der COX-2	14
1.1.7 Chemotherapie mit COX-2-Inhibitoren	18
1.2 Die non-COX-Targets	19
1.2.1 Targets in Signaltransduktionswegen der Apoptose	20
1.2.2 Targets mit Einfluß auf die Zellproliferation	21
1.3 Ovarialkarzinome, COX-2 und NSAIDs	22
2 Zielstellung	23
3 Material und Methoden	24
3.1 Antikörper, Chemikalien und Kits	24
3.2 Instrumente, Software und Verbrauchsmaterial	25
3.3 Gele, Puffer und Lösungen	25
3.4 Zelllinien und Zellkultur	26
3.5 XTT-Proliferationsassay	26
3.6 siRNA-Transfektion	27
3.7 PGE2-ELISA	28
3.8 Durchflußzytometrie	28
3.8.1 Annexin V/PI	29
3.8.2 DNA-Färbung nach Nicoletti	30
3.8.3 BrdU/PI-Labeling	31
3.9 Western Blot	32
3.10 Signifikanztestung	33
4 Ergebnisse	34
4.1 Beeinflussung der Zellproliferation durch Cyclooxygenase-2-Inhibition	34
4.1.1 Einfluß von NS-398 auf die Proliferation	34

4.1.2 Einfluß von Indomethacin auf die Proliferation.....	39
4.1.3 Proliferationseinfluß von COX-1- und COX-2-siRNA	41
4.2 Beeinflussung der Apoptose durch Cyclooxygenase-2-Inhibition.....	44
4.2.1 Einfluß von NS-398 auf die Apoptose	44
4.2.2 Einfluß auf die Apoptose durch COX-1-, COX-2-siRNA	48
4.3 COX-2-Inhibition - Einfluß auf den Zellzyklus	50
4.3.1 Einfluß von NS-398 auf den Zellzyklus.....	50
4.3.2 Beeinflussung des Zellzyklus durch COX-1- und COX-2-siRNA	53
4.3.3 Einfluß von NS-398 auf die S-Phase des Zellzyklus	54
5 Diskussion	56
5.1 Einfluß von NS-398 auf Proliferation und Apoptose von Ovarialkarzinomzelllinien.....	56
5.2 Mögliche Zellzyklus-Targets der NSAIDs	61
5.3 Apoptosepriming durch NSAIDs – klinische Perspektiven.....	64
6 Zusammenfassung und Ausblick	66
7 Literaturverzeichnis.....	68
8 Eidesstattliche Erklärung.....	77
9 Danksagung.....	78

Abstract

Several studies have provided evidence that the Cyclooxygenase-2 (COX-2) plays a key role in tumorigenesis and that this enzyme is linked to malignancy and prognosis of cancer. Therefore, COX-2-inhibitors are already evaluated in clinical trials as chemotherapeutics against diverse cancers, such as breast, prostate and colorectal cancer. COX-2 is the inducible isoform of cyclooxygenase - the enzyme catalyzing the synthesis of prostaglandins and other eicosanoids. Several studies suggest that COX-2 plays an important role in tumor development and progression. The usefulness of cyclooxygenase-inhibitors (Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs, NSAIDs) as drugs against cancer has already been investigated in animal models and cell culture experiments. The results of these studies have shown, however, that it is not clear, whether the observed antitumor effects of NSAIDs are due to inhibition of the COX-enzyme or mediated via a COX-independent mechanism through a so-called non-COX-target.

In the present study we investigated effects of inhibition of COX isoforms by the NSAID NS-398, a selective COX-2-inhibitor, as well as by COX-isoform specific RNA interference (RNAi) in the human ovarian carcinoma cell lines OVCAR-3 and SKOV-3. OVCAR-3 cells showed a constitutive expression of COX-1 and a highly inducible expression of COX-2 after stimulation with interleukin-1 β resulting in production of high levels of Prostaglandin E2 (PGE2). SKOV-3 cells were negative for both COX isoforms. While COX-2-inhibition with RNAi reduced PGE2-levels in the supernatants of OVCAR-3, COX-1-inhibition by RNAi had no influence on PGE2-production measured by PGE2-specific ELISA. Therefore COX-2 seems to be the main source of PGE2 in OVCAR-3 cells. In these cells PGE2-synthesis - and thus the COX-2-enzyme activity - was completely inhibited by NS-398 in concentrations of 1 μ M. Increasing amounts of NS-398 (>10 μ M) had an additional antiproliferative effect. This growth inhibition was also observed in the COX-negative cell line SKOV-3 and could not be reverted by exogenous addition of PGE2 (10 μ M). Flowcytometric analysis revealed, that this growth inhibition was based on a G0/G1-cell-cycle-arrest. There was no evidence for apoptosis induced by NS-398. In contrast, neither COX-1 nor COX-2-inhibition by RNAi led to similar effects on proliferation and cell cycle progression as observed with NS-398. COX-RNAi also did not induce apoptosis.

These results suggest that a COX-independent mechanism is responsible for the NS-398 induced G0/G1-arrest. Further investigations are needed to elucidate how NS-398 induces cell cycle arrest. Hopefully, this would make it possible to increase the specificity of NS-398 and other NSAIDs as chemotherapeutics.

1 Einleitung

Die Gruppe der Nichtsteroidalen Antiphlogistika (Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs, NSAIDs) weist eine lange Geschichte in der Medizin auf. Seit der ersten Anwendung von Aspirin 1899 bei einer Arthritis haben die NSAIDs aufgrund ihrer antientzündlichen, antipyretischen und analgetischen Eigenschaften und den daraus resultierenden vielfältigen therapeutischen Einsatzmöglichkeiten einen hohen Stellenwert erlangt. Das Spektrum reicht von der Behandlung von Kopfschmerzen bis zur Therapie kardiovaskulärer, entzündlicher und rheumatischer Erkrankungen. Seit einiger Zeit wird auch ihr chemopräventiver Einsatz in bezug auf verschiedene Krebserkrankungen diskutiert. Mehrere epidemiologische Studien haben gezeigt, daß durch die Einnahme von Aspirin und anderen NSAIDs das Risiko, an einem kolorektalen Karzinom zu erkranken, deutlich gesenkt wird [1,2]. Bei Patienten mit Familiärer adenomatöser Polyposis (FAP) konnten durch Gabe von Sulindac sowohl die Größe als auch die Anzahl der Polypen signifikant reduziert werden [3,4].

Derzeit laufen bereits Phase II/III-Studien zum Einsatz von Celecoxib (Celebrex® von Pharmacia/Pfizer) als neoadjuvantes Therapeutikum bei metastasierendem Brustkrebs, Bronchialkarzinomen, kolorektalen Karzinomen, Prostatakarzinomen, Kopf-Hals-Tumoren und Melanomen [5].

Jedoch wird der Mechanismus, über den die NSAIDs ihre chemopräventiven Effekte vermitteln, derzeit kontrovers diskutiert, denn die Ergebnisse von Zellkulturexperimenten und Tierversuchen zeichnen ein sehr vielfältiges Bild mit teils widersprüchlichen Erkenntnissen.

Der seit langem bekannte Angriffspunkt dieser Medikamente in der Zelle besteht in der Inhibition des Enzyms Cyclooxygenase (COX), auch genannt Prostaglandin Endoperoxid H Synthase (PGH-Synthase, PHS) [6].

Insbesondere die COX-2, eine Isoform der Cyclooxygenase, rückte in den letzten Jahren ins Zentrum wissenschaftlichen Interesses, da dieses Enzym in Zusammenhang mit Tumorentstehung und -progression gebracht werden konnte [7].

Kürzlich veröffentlichte Ergebnisse der Arbeitsgruppe zeigen, daß die COX-2 einen unabhängigen Prognosefaktor in Ovarialkarzinomen darstellt [8].

In dieser Arbeit soll die Wirkung des selektiven COX-2-Inhibitors NS-398 auf epitheliale Ovarialkarzinome in der Zellkultur untersucht werden.

1.1 Das klassische Target der NSAIDs: Die Cyclooxygenase

1.1.1 Die physiologische Rolle der Cyclooxygenase

Die Cyclooxygenase ist ein Schlüsselenzym des Arachidonsäurestoffwechsels (Abb.1). Sie ist neben der Lipoxygenase maßgeblich an der Herstellung von Eikosanoiden beteiligt. Eikosanoide stellen einen Oberbegriff für Prostaglandine, Thromboxane und Leukotriene dar. Hierbei handelt es sich um Derivate mehrfach ungesättigter Fettsäuren, speziell der Arachidonsäure. Diese Verbindungen werden in den meisten tierischen Geweben produziert. Dort vermitteln sie z.B. Reaktionen auf hormonelle Stimuli oder Entzündungsreize.

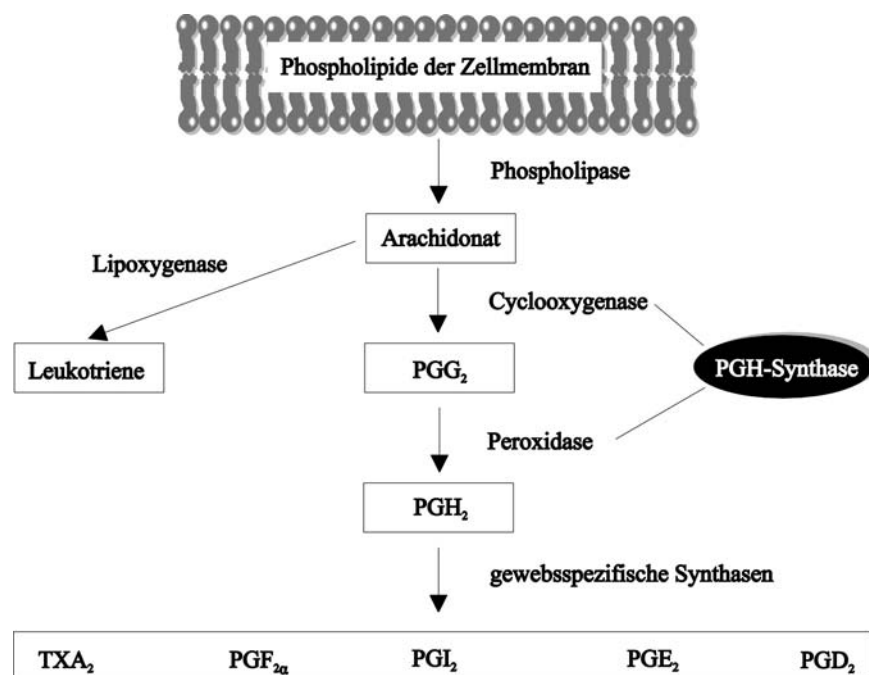


Abbildung 1: Die Phospholipase A₂ spaltet aus Membranphospholipiden die Arachidonsäure ab. Durch die Cyclooxygenase wird zunächst die Säure durch Oxidation zum instabilen Prostaglandin G₂ zyklisiert und anschließend durch die Peroxidaseaktivität der COX zum Prostaglandin H₂ (PGH₂) oxidiert. Ausgehend davon werden je nach enzymatischer Ausstattung der Zelle weitere Prostaglandine hergestellt.

Die Stimuli zur Herstellung der Prostaglandine umfassen vielfältige zellspezifische, physiologische, physikalische und pharmakologische Reize [9]. Beispiele physiologischer Stimuli sind Histamin, Bradykinin, Arginin Vasopressin, Platelet Activating Factor, Angiotensin II, Interleukin-1, Leukotriene und Thrombin. Diese bewirken typischerweise über G-Protein-gekoppelte Rezeptoren der Zellmembran die Aktivierung der Phospholipase und somit die Freisetzung der Arachidonsäure. Zu den physikalischen Stimuli zählen z.B. endotheliale Scherkräfte. Pharmakologische Stimuli sind u.a. Substanzen, die die intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration erhöhen, da das Wirkoptimum der Phospholipasen bei höheren Ca^{2+} -Konzentrationen liegt. Es gibt auch Hinweise auf eine direkte Aktivierung der Phospholipasen durch Proteinkinase C-abhängige Phosphorylierung.

Schließlich kann die Arachidonsäure auch selbst die Herstellung von Prostaglandinen aktivieren. Sie soll der interzellulären Kommunikation dienen, indem sie von einer Zelle freigesetzt zur vermehrten Prostaglandinherstellung in der Nachbarzelle führen kann. Auf diese Art wird z.B. in Makrophagen die Thromboxansynthese durch Thrombozyten aktiviert.

1.1.2 Die Prostaglandine

Prostaglandine wirken sowohl autokrin als auch parakrin. Sie werden vermutlich durch Carrier aus der Zelle ausgeschleust. Die Rezeptoren der Prostaglandine sind second messenger – gekoppelt, teils via Adenylatzyklaseaktivierung und resultierendem cAMP-Anstieg, teils durch IP3-vermittelten Ca^{2+} -Anstieg. Die Funktionen der Prostaglandine sind je nach Art und Gewebe äußerst verschieden und oftmals gegensätzlich. Sie reichen von Vasokonstriktion vs. Vasodilatation, Stimulation vs. Inhibition der Plättchenaggregation bis zu Immunsuppression bzw. -modulation (Tab.1). Einige Arbeiten zeigen, daß exogen applizierte Prostaglandine die Proliferation von Tumorzellen fördern [10,11].

Tabelle 1: Auswahl von Funktionen und Rezeptoren der Prostaglandine [6,12]

Prostaglandin	Vorkommen	Funktion	Rezeptoren
Prostaglandin D2 (PGD2)	Mastzellen, Gehirn	inhibiert Plättchenaggregation, Bronchokonstriktion, Schlafinduktion	DP1, DP2
Prostaglandin E2 (PGE2)	Gehirn, Niere, glatter Muskel von Blutgefäßen, Thrombozyten		EP1, EP2, EP3, EP4
Prostaglandin F2 α (PGF2 α)	Uterus, Lunge, glatter Muskel von Blutgefäßen, Auge		FP α , FP β
Prostacyclin (PGI2)	Endothel, Niere, Thrombozyten, Gehirn	inhibiert Plättchenaggregation, Vasodilatation	IP3
Thromboxan A2 (TXA2)	Thrombozyten, glatter Muskel von Blutgefäßen, Makrophagen, Niere	Plättchenaggregation, Vasokonstriktion	TP α , TP β

1.1.3 Die Isoformen der Cyclooxygenase

Seit 1993 ist nachgewiesen, daß die Cyclooxygenase in zwei Isoformen existiert [13]. Die Gene befinden sich auf verschiedenen Chromosomen: COX-1 auf Chromosom 9, COX-2 auf Chromosom 1. Die Proteine sind zu 61% identisch, haben denselben Reaktionsmechanismus und ähnliche Affinität für ihr Substrat Arachidonsäure. Allerdings unterscheiden sie sich deutlich im Expressionsmuster und in ihrer Sensitivität gegenüber NSAIDs. Die COX-1 ist konstitutiv in den meisten Geweben exprimiert. Sie versorgt die Zellen mit den notwendigen Prostaglandinen zur Wahrnehmung physiologischer Funktionen, z.B. als Magenschleimhautschutz oder zur Regulation des renalen Blutflusses. Hingegen wird die COX-2 nur in einigen Organen im Rahmen von Adaptationsvorgängen physiologisch exprimiert, so z.B. bei Wundheilung, Ovulation, Weheninduktion. In Entzündungsgebieten wird die COX-2 durch inflammatorische Stimuli induziert. Ihre Expression ist stark reguliert (Tab.2).

Mittlerweile wurde auch die Existenz weiterer Isoformen der COX (COX-3, PCOX-1a) beschrieben [14]. Da jedoch bisher zuwenig Informationen über deren Expression und Rolle vorliegen, kann im Rahmen dieser Arbeit nicht weiter darauf eingegangen werden.

Tabelle 2: Die Isoenzyme der Cyclooxygenase [7,13]

	COX-1	COX-2
Regulation	konstitutiv	induzierbar durch TNF, Lipopolysaccharid, IL-1, Phorbol ester, TPA
Molekulargewicht	72kDa	72kDa und 74kDa
Größe des Gens	22 kB	8.3 kB
humanes Chromosom	Chromosom 9	Chromosom 1
Größe der mRNA	2.7 kB	4.5 kB
Lokalisation	Endoplasmatisches Retikulum, Kernhülle	Endoplasmatisches Retikulum, Kernhülle
Gewebeexpression	ubiquitär	Niere, Kolon, Gehirn, Rückenmark, Ductus deferens, Entzündungsgebiete, Malignome
Promotor		NFκB, NF-IL6, CRE, TCF

1.1.4 Inhibitoren der COX-1 und COX-2 - selektive COX-Hemmer

Die Cyclooxygenase ist das Target der NSAIDs. Diese Substanzen interagieren mit dem aktiven Zentrum des Enzyms, indem sie die Bindung von Arachidonsäure unterdrücken. Sie haben jedoch keinen Einfluß auf die Peroxidaseaktivität [6]. Die COX-Hemmung durch Aspirin ist aufgrund der kovalenten Bindung irreversibel und dadurch von großer pharmakologischer Bedeutung insbesondere bei der Thrombozytenaggregationshemmung. Thrombozyten sind aufgrund ihres fehlenden Zellkerns nicht in der Lage, das Enzym nachzubilden. Daher wirkt die Hemmung über die gesamte Lebensdauer der Zelle, die ungefähr fünf Tage beträgt. Bei der dauerhaften Anwendung von Aspirin und anderen nichtselektiven NSAIDs tritt als unerwünschte Nebenwirkung ein erhöhtes Risiko für Plättchendysfunktion, Blutungen und Bildung von gastrointestinalen Ulzera und Nierenschäden auf, denn mit der Inhibition der COX-1 wird die Produktion von physiologisch notwendigen Prostaglandinen gehemmt. Aus diesem Grund wurde versucht, die Selektivität der NSAIDs für die COX-2 zu erhöhen. Da sich die Isoenzyme an der NSAID-Bindungsstelle in einer Aminosäure unterscheiden, war es möglich, durch chemische Modifizierung funktioneller Gruppen selektive COX-2-Inhibitoren herzustellen (Abb.2).

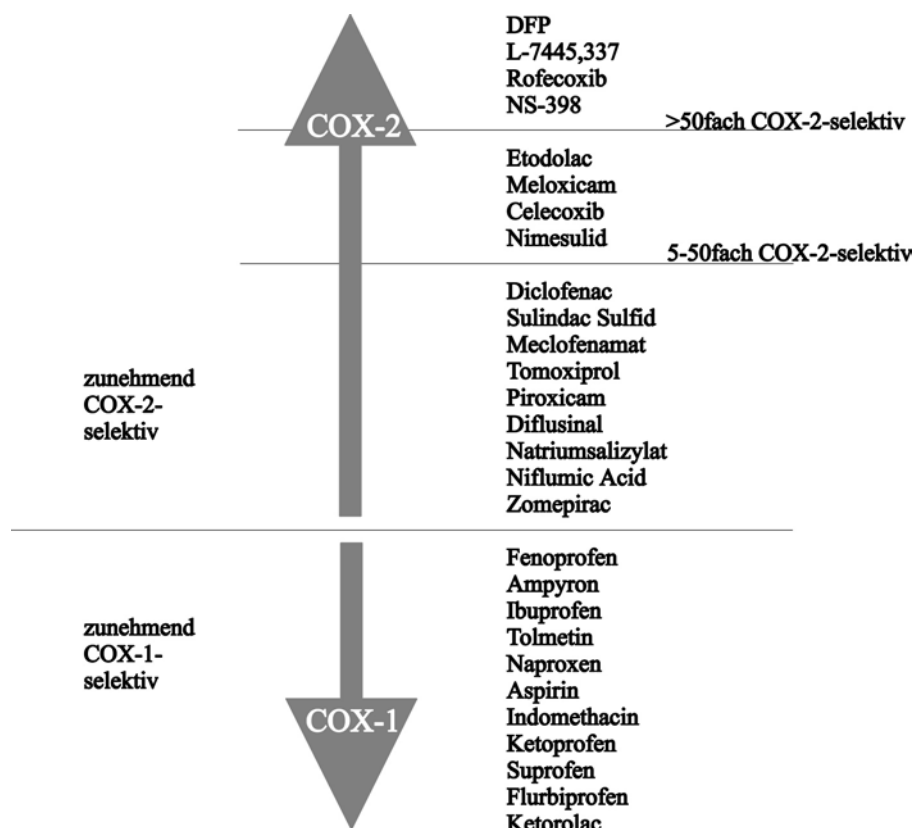


Abbildung 2: Selektivitäten der NSAIDs nach Warner [15]

Seit einigen Jahren sind Rofecoxib (Vioxx® von MSD) und Celecoxib (Celebrex® von Pharmacia/Pfizer) in der klinischen Anwendung. Besonders für Dauertherapien und hochdosierte Therapien z.B. bei der Rheumatoiden Arthritis ist die Einnahme selektiver COX-2-Hemmer gegenüber klassischen NSAIDs zu bevorzugen, da die gastrointestinalen Nebenwirkungen deutlich geringer sind. Allerdings kommt es bei langfristiger Einnahme von COX-2-Hemmern oder in Kombination mit ASS ebenfalls zu einer Zunahme von gastrointestinalen Ulzera und Blutungen.

Klinische Studien zur Untersuchung des Einsatzes von COX-2-Hemmern bei Familiärer adenomatöser Polyposis (FAP) haben ergeben, daß durch Celecoxibeinnahme die Polypenzahl um 30% reduziert werden konnte [16]. Aufgrund dieser Studien hat die Food and Drug Agency 1999 in den USA Celecoxib für die Behandlung von FAP zugelassen.

Obwohl Celecoxib bereits in diversen klinischen Studien auf seinen adjuvanten Einsatz bei Krebserkrankungen untersucht wird, bleibt der Mechanismus noch immer umstritten, der für die zell- und tierexperimentell beobachtete Wirksamkeit von NSAIDs gegen Tumoren verantwortlich ist.

1.1.5 COX-2-Expression und Malignität

In malignen Tumoren konnte eine verstärkte Expression der Cyclooxygenase-2 festgestellt werden, so z.B. in kolorektalen Karzinomen [17], in Adenokarzinomen von Lunge [18,19], Prostata [20], Pankreas [21], Magen [22] und in Kopf- und Halstumoren [23].

Zur experimentellen Untersuchung der Familiären adenomatösen Polyposis wurden entsprechend FAP-Knockout-Mäuse hergestellt, welche sich als brauchbares Modell der FAP erwiesen haben. Da, wie oben beschrieben, die COX-2-Hemmung bei Patienten mit FAP günstige Effekte hatte, wurden COX-2-Knockout-Mäuse mit FAP-Knockout-Mäusen gekreuzt. Die COX-2/FAP-Knockouts entwickelten wesentlich weniger Polypen als die FAP-Knockout-Tiere. Außerdem konnte durch zusätzliche Gabe eines COX-2-Inhibitors die Polypenzahl der FAP-Knockout-Mäuse weiter drastisch reduziert werden [24]. Aufgrund dieser Ergebnisse wies man der COX-2 eine Schlüsselrolle bei der Tumorentwicklung des kolorektalen Karzinoms zu.

Eine andere Arbeit zeigt, daß die Überexpression der COX-2 in den Milchdrüsen von transgenen Mäusen zu Dysplasien und Tumorbildung führt [25].

Es ergaben sich ferner Hinweise auf eine Korrelation der COX-2-Expression mit der Prognose der Erkrankung:

Bei Magenkarzinomen ist die COX-2-mRNA-Expression signifikant mit Stadium und Tumorgröße korreliert [26]. Duke's stage, Tumorgröße und -differenzierung korrelierten auch bei kolorektalen Karzinomen mit vermehrter COX-2-Expression [27].

Schlechtere Überlebensraten wurden bei COX-2-positiven kolorektalen Karzinomen [27], Bronchialkarzinomen [28,29] und bei Ovarialkarzinomen [8] festgestellt.

Es konnten Zusammenhänge zwischen der COX-2-Überexpression in Tumoren und Apoptoseresistenz der Zellen nachgewiesen werden. Des weiteren haben COX-2-positive Tumoren einen höheren Vaskularisationsgrad, größere Invasivität und ein höheres Metastasierungspotential als COX-2-negative Tumoren (Tab.3).

Tabelle 3: Experimentelle Untersuchungen zum Zusammenhang von Tumormalignität und COX-2-Expression

Apoptoseresistenz	<ul style="list-style-type: none"> • in intestinalen Epithelzellen von Ratten, die mit einem COX-2-Expressionsvektor transfiziert wurden, nahm die Resistenz gegenüber Butyrat-induzierter Apoptose zu • die Apoptoseinhibition wurde durch Gabe von Sulindac Sulfid aufgehoben [30]
Metastasierung	<ul style="list-style-type: none"> • bei Patienten mit hoher Expression von COX-2 im Primärtumor (Magenkarzinom bzw. kolorektales Karzinom) traten vermehrt Lymphknotenmetastasen auf [26,27] • der Anteil an Tumorzellen mit vermehrter COX-2-Expression lag in Lymphknotenmetastasen wesentlich höher als im Primärtumor (Bronchialkarzinom) [29]
Angiogenese	<ul style="list-style-type: none"> • die Dichte der Mikrogefäße in Tumoren stieg mit der COX-2-Expression [27,31]
Invasivität und Adhäsivität	<ul style="list-style-type: none"> • eine Zunahme von Invasivität [30] und Adhäsivität an die extrazelluläre Matrix [30] wurde bei Kolonkarzinomzelllinien beobachtet, die durch Vektortransfektion zur COX-2-Überexpression gebracht wurden

Es gibt verschiedene Theorien zu den molekularen Wirkmechanismen, über welche die COX-2 die Malignität von Tumoren beeinflussen kann. Diese sollen im folgenden dargestellt werden.

1.1.6 Erklärungsmodelle zu den tumorigenen Eigenschaften der COX-2

Inhibition der Apoptose – Steigerung der Proliferation

Prostaglandine, die Hauptprodukte der COX, davon insbesondere PGE₂, sollen antiapoptotische bzw. wachstumsfördernde Effekte haben [11]. Bei der Untersuchung von Kolonkarzinomen wurden im Tumorgewebe signifikant erhöhte PGE₂-Level gegenüber normaler Mukosa gefunden [32]. Kolonkarzinomzelllinien zeigten bei Behandlung mit COX-2-Inhibitoren eine 1,5-fache Steigerung der Apoptose, der Effekt war rückläufig unter PGE₂-Zugabe [33]. Andere Studien konnten nur proliferative jedoch keine antiapoptotischen Prostaglandinwirkungen feststellen [11,34].

Es gibt jedoch bisher nur wenige Hinweise auf einen Signaltransduktionsweg, durch den Prostaglandine direkt Apoptose oder Proliferation beeinflussen können. Ansatzpunkte dafür bieten folgende Arbeiten:

Die Peroxisom Proliferator-aktivierten Rezeptoren (PPARs), bei denen u.a. Eicosanoide als Liganden fungieren [35,36] sind Mitglieder der Klasse der Nukleären Hormonrezeptoren, die als Transkriptionsfaktoren bei Wachstum, Differenzierung und Apoptose der Zellen eine wichtige Rolle spielen. Eine vermehrte kolokalisierte Expression von PPAR δ und COX-2 wurde in kolorektalen Karzinomen gezeigt [37]. Dieser Rezeptor steht in Zusammenhang mit Karzinogenese, da er apoptoseinhibierende Effekte vermittelt [38]. PPAR δ wird in kolorektalen Karzinomzellen durch Prostacyclin (PGI₂) aktiviert [37], d.h., die Apoptoseinhibition in Kolonkarzinomzellen könnte auf diesem Wege durch ein Prostaglandin vermittelt werden.

Andererseits gibt es auch die Beobachtung, daß PGJ₂ (ein Metabolit von PGD₂) als Ligand an PPAR γ durch Induktion von Apoptose das Wachstum von Bronchialkarzinomzellen inhibieren konnte [36]. Aufgrund dieser unterschiedlichen Ergebnisse wird vermutet, daß die Rolle der COX-2 bei der Apoptosemodulation und intestinalen Tumorigenese u.a. in ihrer Fähigkeit begründet liegt, das Spektrum der PPAR-Liganden zu verändern [38].

Weitere Hinweise für die Vermutung, daß PGE₂ eher auf antiapoptotische Signaltransduktionswege wirkt, ergaben sich aus der Beobachtung, daß in Kolonkarzinomzellen durch PGE₂-Gabe die Expression des antiapoptotischen Proteins Bcl-2 gesteigert wurde [33]. Analog dazu wurde in einer anderen Arbeit gezeigt, daß die vektorielle Überexpression der COX-2 in intestinalen Epithelzellen von Ratten zu Apoptoseresistenz und damit einhergehender vermehrter Bcl-2-Produktion führte [30]. Außerdem konnte in einer weiteren Studie durch selektive COX-2-Inhibition mit NS-398 in Prostatakarzinomzellen die Bcl-2-Expression

verringert werden [39]. Andererseits war bei Celecoxib-induzierter Apoptose ebenfalls in Prostatakarzinomzellen keine Veränderung der bcl-2-Level nachweisbar. Auch die vektorielle Überexpression von bcl-2 stellte keinen Schutz gegen Celecoxib-vermittelte Apoptose dar [40].

Als ein anderer Mechanismus der Apoptoseinduktion durch NSAIDs wird eine Schlüsselfunktion der Arachidonsäure - das Substrat der COX - diskutiert. In Zellen, die mit COX-Inhibitoren behandelt werden, steigt die Arachidonsäurekonzentration an, da das Substrat nicht mehr verstoffwechselt werden kann. Die Arachidonsäure kann einerseits selbst Apoptosesignal sein [41,42], andererseits führt ein Anstieg der Arachidonsäurekonzentration zur Stimulation der Sphingomyelinase, die Sphingomyelin in Ceramid umwandelt, welches ein potenter Apoptoseinduktor ist. Ceramid führt zu Veränderungen der Mitochondrienmembran, was den Austritt von Cytochrom-c zur Folge hat und somit die Apoptose einleitet [34]. Diese Theorie wird durch den analogen Befund gestützt, daß durch Lipxygenase-Inhibition bewirkter Arachidonsäureanstieg in der Zelle ebenfalls zu Apoptose führen kann [43].

Auch die Caspase-3, ein zentrales Enzym im Prozeß der Apoptose, findet sich unter den möglichen zellulären Proteinen, durch die eine COX-2-abhängige Beeinflussung des Zelltods erklärt wird. Apoptose, die mit der Aktivierung von Caspase-3 einherging, konnte sowohl durch NS-398 in Bronchialkarzinomzellen [44] als auch durch Celecoxib in Prostatakarzinomzellen [40] induziert werden. Phäochromozytomzellen, in denen die COX-2 vektoriell exprimiert wurde, zeigten gegenüber Zellen ohne COX-2-Expression vermehrte Apoptoseresistenz beim Entzug des Überlebensfaktors Nerve Growth Factor (NGF). In COX-negativen Zellen, die mit PGE2 behandelt wurden sowie in COX-2-positiven Zellen war die Aktivität der proapoptotischen Caspase-3 vermindert, was als mögliche Erklärung für die geringere Apoptose dienen könnte [45]. Zusätzlich fanden die Autoren, daß durch COX-2-Überexpression oder durch PGE2-Applikation die Expression des Proteininhibitors (PIN) der neuronalen NO-Synthase (nNOS) erhöht wurde. Die nNOS vermittelt in mehreren Zellsystemen Apoptose durch Produktion von NO, welches durch Reaktion mit Superoxiden als apoptotisches Signal wirken kann. Es wird daher vermutet, daß die COX-2 durch Hemmung der nNO-Synthase-Aktivität protektiv gegenüber apoptotischen Stimuli wirkt [46].

In Mammakarzinomzellen, die COX-2 exprimieren und große Mengen PGE2 produzieren, wurden gleichzeitig die zu Onkogenen mutierten Ki-ras und H-ras gefunden, wohingegen in

Zellen, die keine ras-Deletion aufwiesen, auch keine COX-2-Überexpression nachweisbar war [47]. Mutationen der ras-Gene oder der ras-regulierenden Gene können Tumoren hervorrufen.

Steigerung der Angiogenese

Tumorzellen sichern ihr Wachstum durch Sekretion von Angiogenesestimulatoren, dazu gehören vor allem VEGF (vascular endothelial growth factor), aber auch bFGF (basic fibroblast growth factor; synonym FGF-2) und PDGF (platelet derived growth factor).

Die Synthese von VEGF, der als einer der wichtigsten Faktoren gilt, kann durch die COX-2 bzw. durch deren Produkt PGE₂ stimuliert werden. In Kunststoffimplantaten (subkutane Schwamm-Implantate) bei Ratten, einem Modell zur Untersuchung von Angiogenese, wurde vermehrte COX-2-mRNA-Expression hauptsächlich in den neovaskularisierten Endothelzellen gefunden. Injektion von bFGF stimulierte gleichsam COX-2-mRNA- und VEGF-mRNA-Expression und die Angiogenese in den Implantaten. COX-2-Inhibition führte dagegen zu verminderten VEGF-mRNA-Levels und zu reduzierter Gefäßneubildung. Die Produktion des VEGF erfolgte vor allem in Fibroblasten-ähnlichen Zellen, die um neugebildete Endothelzellen angesiedelt sind, was auf eine parakrine Kommunikation zwischen beiden Zellarten hindeutet [48].

Auch COX-2-Überexpression bei Kolonkarzinomzellen in Kokultur mit Endothelzellen führte zu verstärkter Produktion von Angiogenesefaktoren sowie zur Stimulation von Kapillarröhrenbildung und endothelialer Migration. Durch Gabe von NS-398 und Aspirin konnte die Angiogenese inhibiert werden. Andererseits stellten auch COX-1- und COX-2-negative Karzinomzellen Angiogenesefaktoren her und stimulierten Angiogenese, die durch Aspirin, nicht dagegen durch NS-398, inhibiert wurde. Bei Implantation dieser COX-negativen Zellen als Xenograft in Mäuse konnte eine Wachstumshemmung des Tumors nur durch Aspirin, nicht aber durch COX-2-selektive Inhibitoren erreicht werden. Diese Feststellung ließ die Autoren an eine mögliche Rolle der COX-1 in den Epithelzellen denken. Es konnte gezeigt werden, daß die antisense-COX-1-Ausschaltung in den Epithelzellen zu verminderter Kapillarröhrenbildung führte. Daraus wurde geschlossen, daß sowohl COX-1 in Endothelzellen für die Regulation der Angiogenese verantwortlich ist als auch COX-2, die die Produktion von Angiogenesefaktoren durch Tumorzellen moduliert [49].

Zu den Auswirkungen der Prostaglandine auf das Gefäßwachstum ist weiterhin bekannt, daß PGE₂ die Produktion von Interleukin-6 (IL-6) in humanen Osteoblasten [50] und in Mastzellen

[51] induzieren kann. Es gibt Hinweise für eine IL-6-vermittelte Beeinflussung der Angiogenese in Magenkarzinomen durch Modulation von VEGF [52].

In einer anderen Arbeit wird Thromboxan A2 (TXA2), das von aktiviertem Gefäßendothel produziert wird, als Mediator für COX-2-abhängige korneale Endothelmigration und Vaskularisation verantwortlich gemacht [53].

Steigerung der Invasivität

Mit COX-2 transfizierte Kolonkarzinomzellen zeigten erhöhte Invasivität, die mit der Aktivierung von Matrixmetalloproteinasen (MMPs) korrelierte [54]. Sulindac Sulfid, ein COX-Inhibitor, konnte diesen Effekt inhibieren. Die Expression der MMPs ist sowohl mit erhöhter Invasivität von Tumorzellen durch Basalmembranen und Blutgefäßendothelien als auch mit verstärkter Metastasenbildung assoziiert [55].

Modulation von Inflammation und Immunsuppression

Das Wachstum von Tumorzellen ist häufig mit gleichzeitigen immunsuppressiven Effekten des Tumors auf das Stroma assoziiert. Der Wachstumsfaktor CSF (Colony stimulating factor) wird von Tumorzellen freigesetzt und stimuliert Monozyten und Makrophagen PGE2 herzustellen. PGE2 wiederum hemmt die Produktion von immunregulatorischen Zytokinen, z.B. TNF, sowie die T- und B-Zell-Proliferation und NK-Zellen. Außerdem verstärkt PGE2 die Interleukin-10-Synthese. Damit hat PGE2 vorwiegend immunsuppressive Eigenschaften [56].

Konversion von Prokarzinogenen zu Karzinogenen

Die Peroxidaseaktivität der COX kann durch die Oxidation von Xenobiotica für die Bildung von Mutagenen verantwortlich sein [57]. Hochreaktive Nebenprodukte der Arachidonsäureoxidation können mit DNA interagieren. Aufgrund seiner permanenten Xenobiotica-Exposition ist dieses besonders für den Darmtrakt bedeutsam und wird als mögliche Erklärung für das geringere Risiko, bei jahrelanger NSAID-Einnahme an einem kolorektalen Karzinom zu erkranken, angeführt.

Angesichts dieser Ergebnisse erscheint es höchst vielversprechend, den chemotherapeutischen Einsatz selektiver COX-2-Hemmer bei Tumoren zu prüfen, auch wenn aufgrund der Vielzahl experimenteller Systeme noch nicht klar ist, welche NSAID-Wirkungen biologisch am bedeutsamsten sind.

1.1.7 Chemotherapie mit COX-2-Inhibitoren

Apoptoseinduktion

Mehrere Untersuchungen zeigen, daß COX-2-Hemmer *in vitro* Apoptose induzieren können. Diese sind in folgender Tabelle zusammenfassend dargestellt:

Tabelle 4: Experimentelle Hinweise für Apoptoseinduktion durch COX-2-Hemmer im Zelllinienmodell

NSAID	Zelllinie	Konzentration des NSAIDs zur Apoptose-induktion	Apoptose durch PGE2-Gabe antagonisierbar	Apoptose auch bei COX-2-negativen Zellen
NS-398	Kolorektales Karzinom, Adenom [58]	60-70µM	nein	ja
NS-398	Ösophageales Adenokarzinom [59]	0,1-10µM	nicht untersucht	nein
NS-398	Ösophageales Karzinom [60]	100µM	ja	nein
NS-398	Prostatakarzinom [39]	100µM	nicht untersucht	nein, allerdings wurden hier fetale Prostata-Fibroblasten verwendet
Nimesulid	Bronchialkarzinom [61]	100µM	nicht untersucht	ja
Celecoxib	Prostatakarzinom [40]	50µM	nicht untersucht	nicht untersucht
JTE-522	Magenkarzinom [62]	250µM	nicht untersucht	nicht untersucht
SC-58125	Kolonkarzinom [33]	25µM	ja	nicht untersucht

Auch verschiedenste nichtselektive NSAIDs wie z.B. Aspirin, Indomethacin, Naproxen, Piroxicam, Sulindac Sulfon, Sulindac Sulfid und Sulindac zeigten in Kolonkarzinomzelllinien proapoptotische Effekte [zusammengefaßt in 63].

Beeinflussung der Invasivität und Metastasierung

Aspirin und NS-398 konnten bei Hepatomzellen die durch HGF (Hepatocyte Growth Factor) induzierte Invasivität der Zellen im Matrigel-Invasionsassay hemmen [64].

COX-2-selektive Inhibitoren hemmten außerdem die Matrigel-Invasion von Bronchialkarzinomen sowie die Spontanmetastasierung in SCID-Mäusen [29].

Hemmung der Zellproliferation

SC-58125, ein selektiver COX-2-Inhibitor, führte bei Xenograft-Mäusen mit menschlichen Kolonkarzinomzellen zu Wachstumshemmung der Tumoren. Es konnte keine Apoptose festgestellt werden statt dessen aber eine verzögerte Zellzyklusprogression beim G2/M-Phasen-Übergang [65].

Aspirin und Indomethacin reduzierten das Zellwachstum von Bronchialkarzinomzellen *in vitro* und in Xenograft-Mäusen [66]. NS-398 (50µM) konnte unabhängig von der COX-2-Expression das Zellwachstum von hepatozellulären Karzinomen hemmen [67].

1.2 Die non-COX-Targets

Bereits seit einigen Jahren mehren sich die Hinweise dafür, daß die antitumorigenen Eigenschaften der NSAIDs nicht nur COX-1- oder COX-2-abhängig sind, sondern auch über sogenannte non-COX-Targets vermittelt werden. Auffällig erscheinen besonders die im Vergleich zur IC₅₀ der COX meist viel höheren Konzentrationen, die zur Apoptoseinduktion oder Proliferationshemmung notwendig sind. Außerdem wurden vergleichbare antiproliferative bzw. apoptotische Effekte auch in COX-2-negativen Zellen erzielt (Tab.4). Die erzielten Effekte waren oftmals nicht durch Gabe von Prostaglandinen antagonisierbar, was zusätzlich einen Prostaglandin-unabhängigen Mechanismus vermuten läßt [Tab.4;68].

Im Rattenmodell mit Azoxymethan-induzierten Kolonmalignomen konnte durch Gabe von Sulindac-Sulfon, einem Metaboliten von Sulindac, der keine COX-Inhibition bewirkt, in gleicher Weise wie durch Sulindac und Piroxicam Anzahl und Größe an Adenomen und Karzinomen verringert werden [69].

Diese und andere Hinweise motivierten zur Suche nach COX-unabhängigen Targets. Dabei divergieren die Ergebnisse teilweise sehr stark zwischen den einzelnen NSAIDs und den untersuchten Zellarten.

1.2.1 Targets in Signaltransduktionswegen der Apoptose

Als mögliches COX-unabhängiges Target wird z.B. der Nuclear Factor kappa B (NFκB) diskutiert. Dieser gilt als Überlebens- und Proliferationsfaktor, kann aber auch Apoptose induzieren – je nach Zelltyp und Induktor [70]. Z.B. ist NFκB-Expression vermutlich mit Mammakarzinomen assoziiert, da hohe Konzentrationen dieses Faktors in den Zellkernen von Mammakarzinomen gefunden wurden, während die Zellkerne von normalem Epithel der Mamma nur sehr wenig NFκB aufwiesen [71].

Untersuchungen zeigten, daß Aspirin, Salizylat und Sulindac durch Verhinderung der NFκB-Aktivierung die Apoptose beeinflussen [72,73]. Durch diese Medikamente wird die Abspaltung des IκB von NFκB blockiert, wodurch NFκB nicht aktiviert wird, d.h. nicht in den Zellkern translozieren und die Expression von verschiedenen Genen regulieren kann.

Sulindac als auch die Metabolite Sulindac Sulfid und Sulindac Sulfon inhibierten in Kolonkarzinomzellen die NFκB-Aktivierung und induzierten Apoptose [72]. Sulindac Sulfon besitzt keine COX-inhibitorischen Eigenschaften.

Aspirin konnte die Invasivität von Epstein-Barr-Virus-assoziierten Tumorzellen *in vivo* und *in vitro* durch Verringerung der Bildung von Matrixmetalloproteinase-9 (MMP-9) reduzieren [74]– einhergehend mit einer Inhibition der NFκB-Aktivierung. Die MMP-9-Expression wird durch NFκB reguliert [75].

Andererseits wird über Kolonkarzinomzellen berichtet, daß nach Behandlung mit Aspirin NFκB durch komplette Degradation von IκBα, dem NFκB-inhibierenden Protein, aktiviert wird, was ebenfalls mit vermehrter Apoptose einherging [76].

Diese vermutlich aufgrund unterschiedlicher Zellsysteme und der eingesetzten Konzentrationen widersprüchlich erscheinenden Daten weisen auf zelltypspezifische sowohl positive als auch negative Regulation des NFκB durch NSAIDs hin; es liegt offensichtlich kein einheitlicher Mechanismus vor. Zusätzlich kann NFκB möglicherweise auch indirekt über andere zelluläre Targets der NSAIDs beeinflusst werden:

Über Celecoxib wurde berichtet, daß es Apoptose in Prostatakarzinomen induziert, indem es die Phosphorylierung der Proteinkinase B (PKB/Akt) hemmt und somit auch deren antiapoptotische Aktivität [40]. Dieser Aspekt ist insofern interessant, da die PKB wiederum NFκB aktivieren kann: In humanen Leukämiezellen führte die PKB-Überexpression zu Apoptoseresistenz und vermehrter NFκB-Aktivierung [77].

Die zuvor bereits erwähnten Peroxisom-Proliferator-aktivierten Rezeptoren (PPARs, vgl. 1.1.6), die durch NSAIDs inhibiert werden, wurden ebenfalls in Zusammenhang mit COX-unabhängigen Mechanismen der NSAIDs gebracht: PPAR δ -Aktivität konnte sowohl durch Sulindac als auch durch Sulindac Sulfon, ein Metabolit ohne COX-inhibitorische Eigenschaften, gehemmt werden, was die Autoren darauf zurückführen, daß einige NSAIDs die Bindung von PPAR δ an die DNA direkt inhibieren [78].

Des weiteren können Liganden an PPAR γ , zu denen auch das COX-Produkt PGJ2 zählt, die Aktivierung von NF κ B in Kolonkarzinomzellen inhibieren [79], so daß eine indirekte Beeinflussung des NF κ B durch NSAIDs vorliegen könnte.

Daher kann man hier sowohl von COX-abhängiger als auch -unabhängiger Regulation ausgehen.

Erwähnt werden soll als weiteres COX-unabhängiges Target der Nerve Growth Factor induced clone B (NGFI-B, synonym Nur77 oder TR3). Dieser Faktor führt nach Aktivierung durch apoptotische Stimuli zu Cytochrom-c-Freisetzung aus den Mitochondrien und somit zum programmierten Zelltod [80]. Indomethacin konnte in Kolonkarzinomzellen Apoptose hervorrufen, die mit Nur77-Induktion assoziiert war [81].

1.2.2 Targets mit Einfluß auf die Zellproliferation

Weitere Arbeiten zeigen NSAID-Targets im Zellzyklus (p21, p27, p53, CDKs, Cycline) und in der Streßantwort von Zellen (MAP-Kinase-Kaskade: IKK, Erk1/2, p38, JNK, p90RSK; Hitzeschockproteine: HSF-1, Hsp70) [zusammengefaßt in 70]. Auf Zellzyklustargets der NSAIDs bzw. der COX-2-Inhibitoren soll im Zusammenhang mit der Diskussion dieser Arbeit (vgl. 5.2) noch genauer eingegangen werden.

Die Vielfalt der Ergebnisse bei der Suche nach einem allgemeingültigen Prinzip für die Wirkung der NSAIDs auf die Zelle ist vermutlich in den erheblichen Strukturunterschieden der NSAIDs selbst begründet und in der Vielfältigkeit der untersuchten Zellen, *in vivo* wie *in vitro*.

1.3 Ovarialkarzinome, COX-2 und NSAIDs

Laut den amerikanischen Cancer Statistics 2002 [82] und den geschätzten Daten des Robert Koch-Instituts für die BRD machen Ovarialkarzinome 4% aller neu auftretenden Krebserkrankungen von Frauen aus, ihre Letalität ist aber von den gynäkologischen Krebserkrankungen am höchsten. Ovarialkarzinome werden oftmals erst im fortgeschrittenen Stadium diagnostiziert und haben daher meist eine sehr schlechte Prognose mit einer Fünfjahresüberlebensrate von rund 30% [83]. Derzeit existieren keine erfolgreichen Screening-Programme zur Früherkennung.

Die Rolle der COX-2 bei diesen Tumoren als auch der Einsatz selektiver COX-2-Inhibitoren zur Therapie von Ovarialkarzinomen ist bisher erst wenig charakterisiert. Erhöhte COX-2-Expression konnte bereits sowohl in benignen als auch in malignen Tumoren des Ovars gezeigt werden [84]. Aus einer vorangegangenen Studie der Arbeitsgruppe [8] gibt es Hinweise darauf, daß die COX-2 ein unabhängiger prognostischer Faktor bei Ovarialkarzinomen ist. Im Aszites von Patienten mit malignen Tumoren des Ovars waren die PGE₂-Spiegel signifikant erhöht gegenüber der Kontrollgruppe. Bei Karzinomen mit COX-2-Expression war die mittlere Überlebensrate reduziert, was sich besonders deutlich bei Patientinnen unter 60 Jahren zeigte.

Aus einer anderen Arbeit geht hervor, daß der Anteil an Nonrespondern in der Platin-Chemotherapie erhöht ist, wenn die Tumoren COX-2-Expression aufweisen [85]. Hier konnte jedoch kein Zusammenhang zur Prognose nachgewiesen werden. Die geringe Zahl an Untersuchungen läßt betreffs der prognostischen Bedeutung der COX-2 noch keine abschließenden Aussagen zu.

Die bisherigen Daten zu der Frage, ob die regelmäßige Einnahme von NSAIDs das Erkrankungsrisiko für Ovarialkarzinome senken kann, geben kein eindeutiges Bild. Einige Untersuchungen zeigen ein vermindertes Risiko durch Einnahme von NSAIDs [86], Aspirin [87,88] und Acetaminophen [89]. In einer anderen Arbeit konnte kein Zusammenhang zwischen Aspirin-Einnahme und dem Erkrankungsrisiko nachgewiesen werden [90].

Zu den direkten Wirkungen der NSAIDs auf Ovarialkarzinomzelllinien sind bisher kaum Ergebnisse vorhanden. Es gibt Hinweise auf antiproliferative und apoptoseinduzierende Effekte durch die Behandlung von Ovarialkarzinomzelllinien mit NSAIDs [91]. Auch diese Wirkungen konnten nur in Konzentrationen erreicht werden, die vielfach höher sind als die zur Inhibition der COX-2 benötigten. Es gibt ebenfalls keine Aussagen darüber, ob es sich dabei um COX-abhängige oder -unabhängige Mechanismen handelt. Daher soll diese Problematik in der vorliegenden Arbeit untersucht werden.

2 Zielstellung

In dieser Arbeit soll untersucht werden, welchen Einfluß der selektive COX-2-Inhibitor NS-398 auf Proliferation und Apoptose der Ovarialkarzinomzelllinien OVCAR-3 und SKOV-3 ausübt und ob diese Effekte COX-2-abhängig sind oder über ein non-COX-Target vermittelt werden.

Die zellulären Auswirkungen der pharmakologischen COX-2-Inhibition durch NS-398 sollen mit der COX-2-Ausschaltung durch RNA-Interferenz verglichen werden.

Folgende Fragen ergeben sich speziell:

- Wird durch NS-398 Proliferation und Apoptose in den Ovarialkarzinomzelllinien OVCAR-3 und SKOV-3 beeinflusst ?
- Welche Konzentrationen sind zur Proliferationshemmung oder zur Induktion von Apoptose in den untersuchten Zelllinien notwendig ?
- Läßt sich die Proliferationshemmung oder die Apoptoseinduktion durch PGE2 antagonisieren ?
- Wird durch NS-398 die COX-2 in den untersuchten Zelllinien inhibiert ?
- Ab welcher Konzentration von NS-398 ist die COX-2 inhibiert ?
- Wird durch die COX-2-siRNA Proliferation und Apoptose in den Ovarialkarzinomzelllinien beeinflusst ?
- Hat NS-398 Einfluß auf den Zellzyklus ?
- Beeinflusst die COX-2-siRNA den Zellzyklus ?

3 Material und Methoden

3.1 Antikörper, Chemikalien und Kits

Annexin V-FITC, BD Pharmingen, Heidelberg, D

Anti-BrDU monoklonales Maus-IgG, FITC-konjugiert, BD Pharmingen, Heidelberg, D

Anti-Maus-IgG, gekoppelt mit alkalischer Phosphatase, Tropix, Bedford, USA

BCA Protein Assay Kit, Pierce Rockfort, UK

β-Aktin Antikörper, Chemicon International, Temecula, USA

BrdU, BD Pharmingen, Heidelberg D

CDP-Star Tropix, Bedford, USA

monoklonaler COX-1 Antikörper, Cayman, Ann Arbor, USA

monoklonaler COX-2 Antikörper, Cayman, Ann Arbor, USA

DMEM (Medium), Bio Whittaker Europe, Verviers, Belgien

DMSO, Sigma, Deisenhofen, D

Fötale Kälberserum (FCS), PAA Laboratories, Linz, Au

High range Molekulargewichtsmarker, Sigma, Deisenhofen, D

Indomethacin, Sigma, Deisenhofen, D

Interleukin-1β, rekombinant, human, R&D Systems, Minneapolis, USA

Nitro-Block II Tropix, Bedford, USA

NS-398, Alexis, Grünberg, D

Oligofectamin, Invitrogen, Carlsbad, USA

OPTIMEM-1, Gibco, UK

16,16-dimethyl-Prostaglandin E2, Cayman, Ann Arbor, USA

PGE2-ELISA, R&D Systems, Wiesbaden, D

Trypsin/EDTA-Lösung, Biochrom AG, Berlin, D

siRNAs, XERAGON, Huntsville, USA

XTT-Reagenz, Boehringer, Mannheim, D

weitere Chemikalien Sigma, Deisenhofen, D

3.2 Instrumente, Software und Verbrauchsmaterial

BD CellQuest™ Software Version 4.0.2., Beckton Dickinson, Heidelberg, D

ELISA-Reader Bio-Tek Instruments, Winooski, USA

FACScan Beckton Dickinson, Heidelberg, D

Hyperfilm Amersham, Braunschweig, D

Kulturplatten 12- bzw. 96-Well Falcon/ Becton Dickinson, Heidelberg, D

Microsoft Excel für Windows, Microsoft Corporation

ModFit LT™ Software Version 3.0, Verity Software, Topsham, USA

Potran-Membran, Schleicher und Schwell, Dassel, D

3.3 Gele, Puffer und Lösungen

Annexin V-Bindungspuffer (10mM Hepes/NaOH, pH 7.4; 140mM NaCl; 2,5mM CaCl₂)

Assay-Puffer 1x (20mM Tris-HCl pH 9,8; 1mM MgCl₂)

Blocking-Puffer (0,2% I-Block; 0,1% PBS; 0,1% Tween-20)

Coomassie-Färbelösung (0,6% Coomassie-Blau; G250, 10% Essigsäure)

Nicoletti-Reagenz (PI 50µg/ml; 0,1% Natriumcitrat; 0,1% Triton)

Proteinlysispuffer (60 mM TRIS-HCl pH 6,8; 2% SDS; 100 mM DTT)

Proteinladungspuffer (1,25 ml TRIS-HCl 0,5 M; 2,5 ml Glycerol; 5 ml 20% SDS; 1,25 ml 1%

Bromphenolblau, 20% β-Mercaptoethanol, wird kurz vor Gebrauch zugesetzt)

Sammelgel (4%) (3,2ml H₂O; 0,5ml Acrylamid; 1,25ml 0,5M TRIS-HCl pH 6,8; 50µL

SDS 10%; 50µl APS 10%; 10µl TEMED)

Standardkulturmedium (DMEM, 10% FKS, 2% Glutamin)

Transferpuffer, pH 8,3 (2,9g Glycin; 5,8g TRIS-Base; 0,37g SDS; 200 ml Methanol auf 8000 ml

Aqua bidest)

TRIS-Puffer 10x, pH 7,4 (9g TRIS-Base; 68,5g TRIS-HCl; 87,8g NaCl auf 1000 ml Aqua bid.)

Trenngel (10%) (4,8 ml H₂O; 2,5 ml Acrylamid; 2,5 ml 1,5 M TRIS-HCl pH 8,8; 100µl SDS

10%; 50 µl APS 10%; 5 µl TEMED)

Waschpuffer Western Blot (1% PBS, 0,1% Tween-20)

3.4 Zelllinien und Zellkultur

Die Ovarialkarzinomzelllinien OVCAR-3 und SKOV-3 wurden aus humanen serösen Adenokarzinomen des Ovars isoliert und von der American Type Culture Collection (ATCC) bezogen.

Die Zellen wuchsen unter sterilen Bedingungen bei 37°C in einer H₂O-gesättigten, 5%igen CO₂-Atmosphäre. Die Zelllinien wurden in DMEM-Nährmedium, supplementiert mit 10% fötalem Kälberserum (FCS) und 2mM L-Glutamin, kultiviert. Mediumwechsel erfolgte dreimal pro Woche, Passagen ein- bis zweimal pro Woche.

3.5 XTT-Proliferationsassay

Bei dem XTT-Test handelt es sich um einen Assay zur Bestimmung von Zellproliferation und -vitalität. Das Prinzip des Tests beruht auf der Metabolisierung eines gelben Tetrazoliumsalzes in den orangefarbenen Formazan-Farbstoff durch mitochondriale Dehydrogenasen stoffwechselaktiver Zellen. Der Farbstoff ist wasserlöslich und kann quantitativ im ELISA-Reader bestimmt werden. Die Menge an gebildetem Farbstoff ist direkt proportional zur Anzahl vitaler Zellen.

Konfluente Zellen wurden nach Trypsinierung in einer Dichte von 3000 Zellen/Well in eine 96-Well-Kulturschale ausgesät und wuchsen in Standardmedium. Nach 24h erfolgte ein Mediumwechsel mit FCS-freiem DMEM und anschließende Inkubation mit NS-398 in Konzentrationen von 0,1µM bis 500µM. NS-398 wurde als 100mM Stammlösung in DMSO gelöst. Als Kontrolle diente das Lösungsmittel DMSO in entsprechenden Konzentrationen. Gegebenenfalls wurden die Zellen 1h nach NS-398-Zugabe mit IL-1β 10ng/ml stimuliert.

In gleicher Weise wurde eine Konzentrationsreihe für Indomethacin in Konzentrationen von 1µM bis 200µM angefertigt. Für die siRNA-Transfektion (siehe dort) wurden die Zellen in 24-Well-Platten kultiviert. 72h nach Stimulation/Transfektion erfolgte die Zugabe des XTT-Reagenzes (100µl/96Well, 300µl/24Well). Nach 4 Stunden Reaktionszeit schloß sich die Messung bei 490nm und einer Referenzwellenlänge von 690nm im ELISA-Reader an. Bei den 24-Well-Versuchen wurden zunächst von jedem Well 100µl Überstand nach 4h Inkubation mit dem XTT-Reagenz in 96-Well-Platten überführt und dann gemessen.

3.6 siRNA-Transfektion

Bei dem Prinzip der RNA-Interferenz handelt es sich um eine neue Methode der Gen-Ausschaltung auf der mRNA-Ebene. In die Zielzelle werden kurze doppelsträngige RNA-Fragmente eingeschleust, die sogenannten small interfering RNAs (siRNAs). Diese bringen Endonucleasen der Zelle dazu, die zur siRNA komplementäre zelleigene mRNA zu zerschneiden [92]. Dieser Vorgang ist selbstverstärkend und daher ca. 1000mal effektiver als z.B. eine Antisense-Strategie.

SiRNAs gegen COX-1 und COX-2 wurden nach Anleitung von Tuschl et al. [93] konstruiert und chemisch synthetisiert. Die Targetsequenz für die COX-2-siRNA sind die Basen 291-313 von NM000963.1 (5'aactgctcaacaccggaatttt 3'). Die Targetsequenz für die COX-1-siRNA sind die Basen 1533-1555 von M59979.1 (5'aagtgcctccaaactctatctt 3'). Für einige Experimente wurde eine weitere COX-1-siRNA benutzt, die gegen die Zielsequenz 1719-1741 (5'aagacctgtccctacgtttcctt 3') von M59979.1. gerichtet war. Alle benutzten siRNAs wurden mittels einer BLAST-Suche auf ihre Sequenzspezifität hin untersucht. Sie zeigten keine Homologien zu anderen bekannten humanen Genen. Als unspezifische Kontrolle für siRNA-Transfektionen gilt die Lamin A/C-siRNA [94]. Diese siRNA sowie eine (non-silencing) siRNA ohne Homologien zu bekannten Genen gegen die Zielsequenzen 5'aattctccgaacgtgtcacgttt 3' wurden in den Transfektionen der vorliegenden Arbeit als Kontrollen benutzt.

Konfluente OVCAR-3-Zellen wurden nach Trypsinierung in einer Dichte von 20000 Zellen/Well in eine 24-Well-Kulturschale in DMEM ausgesät. Nach 24h erfolgte ein Mediumwechsel, ebenfalls mit DMEM, daraufhin die Transfektion. Dazu wurden pro Ansatz zunächst 3µl Oligofectamin mit 12µl OPTIMEM 7-10min in einem Eppendorfröhrchen inkubiert. 3µl der jeweiligen siRNA vermischte man in einem weiteren Röhrchen mit 50µl OPTIMEM. Dann wurden die Inhalte beider Röhrchen vorsichtig miteinander vermengt und 20min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend pipettierte man 32µl OPTIMEM zu dem Mix, vortexte und gab den Ansatz (100µl) in das entsprechende Well.

Bei Transfektionen mit Verwendung zweier siRNAs wurden von jeder siRNA nur 1,5µl eingesetzt, um die Toxizität der Transfektion nicht zu erhöhen. Des weiteren war in vorangegangenen Western Blots die Ausschaltung bereits bei der halben siRNA Konzentration (30pM) erfolgreich gezeigt worden [95].

3.7 PGE2-ELISA

Der verwendete PGE2-ELISA (enzyme-linked immuno sorbent assay) basiert auf dem Prinzip der kompetitiven Bindung, wobei zwischen dem Proben-PGE2 und einem Alkalische-Phosphatase-gekoppelten PGE2 um die Bindung an den auf einer Platte fixierten PGE2-Antikörper konkurriert wird. Nach Inkubation und Abwaschen des ungebundenen PGE2 wird durch Substratgabe die Aktivität der mit dem PGE2 an den Antikörper gebundenen Enzyme durch Messung der Absorption bestimmt. Daher ist die Farbintensität umgekehrt proportional zur Konzentration von PGE2 im Überstand der Zellen. Anhand einer Standardkuve wird die Konzentration des PGE2 ermittelt.

Konfluente Zellen wurden nach Trypsinierung in 24-Well-Kulturschalen in einer Dichte von 20000 Zellen/500µl in serumhaltigem Medium ausgesät. 24h später erfolgte nach Mediumwechsel die Inkubation mit NS-398 (1µM-50µM) bzw. die Transfektion mit siRNA. Bei den NS-398-Versuchen wurden die Zellen 1h nach NS-398-Gabe mit IL-1β stimuliert und nach weiteren 24h wurden aus jedem Well Mediumüberstände abgenommen, zentrifugiert (5000U/min, 10min) und bei -20°C gelagert.

Bei siRNA-Transfektion wurde nach 24h Inkubation mit dem Transfektionsreagenz die IL-1β-Stimulation vorgenommen und nach weiteren 24h die Überstände gewonnen.

Die Konzentration von PGE2 in den Überständen konnte mittels eines spezifischen ELISAs nach Anleitung des Herstellers bestimmt werden. Die Extinktion wurde im ELISA-Reader bei 405nm und einer Referenzwellenlänge von 590nm gemessen. Die Konzentration von PGE2 wurde anhand von korrespondierenden Absorptionen der kalkulierten Standardkurve berechnet und in pg/ml angegeben.

3.8 Durchflußzytometrie

Bei der Durchflußzytometrie handelt es sich um ein Meßverfahren, bei dem einzelne Zellen, die auf bestimmte Art und Weise markiert sind, in einer Flüssigkeit schwimmend gescannt werden. Durch Färbung mit fluoreszierenden Substanzen lassen sich dadurch antigene, biochemische oder biophysikalische Eigenschaften von Zellen oder auch Zellkernen quantifizieren. Die quantitative Analyse wurde in dieser Arbeit mit dem FACScan Durchflußzytometer und der Software CellQuest vorgenommen.

3.8.1 Annexin V/PI

In apoptotischen Zellen wird relativ früh im Apoptoseprozeß das Membranphospholipid Phosphatidylserin (PS) von der inneren zur äußeren Seite der Plasmamembran transloziert. Annexin V bindet an PS und somit an Zellen, die PS exponieren. Durch Kopplung von Annexin V an den Fluoreszenz-Farbstoff FITC können die apoptotischen Zellen direkt im FACScan gemessen werden. Da auch nekrotische Zellen PS exponieren, wird die Annexin V-Färbung mit einer Propidiumiodid (PI)-Färbung kombiniert. Bei Verlust der Membranintegrität als Zeichen von Nekrose bzw. später Apoptose kann PI in die Zelle eindringen. Das PI-Signal wird ebenfalls im FACScan gemessen.

Somit läßt sich unterscheiden (Abb.3) zwischen vitalen Zellen (Annexin V-negativ, PI-negativ im unteren linken Quadranten), frühapoptotischen Zellen (Annexin V-positiv, PI-negativ im unteren rechten Quadranten) und nekrotischen (bzw. spätapoptotischen) Zellen (Annexin V-positiv, PI-positiv in den beiden oberen Quadranten).

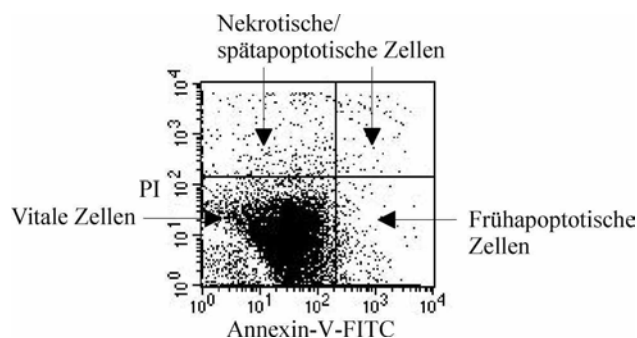


Abbildung 3: Darstellung der Inhalte der Quadranten bei der Annexin V-FITC/PI-Messung

Konfluente Zellen wurden nach Trypsinierung in einer Dichte von 1×10^5 Zellen/Well in 6-Well-Kulturschalen ausgesät. Nach 24h erfolgte die jeweilige Stimulation mit NS-398 bzw. die siRNA-Transfektion (siehe oben). Je nach Meßpunkt 24h, 48h oder 72h später wurden die Zellen geerntet, zentrifugiert (1100Upm, 5min), mit 1xPBS gewaschen und erneut zentrifugiert. Nach Absaugen vom PBS wurden auf jedes Pellet 2µl Annexin-V-FITC, 100µl Annexin-Bindungspuffer und 10µl Propidiumiodid gegeben, 15min bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert und anschließend am FACS gemessen.

Der Zellzyklus in der Durchflußzytometrie

Der Zellzyklus gliedert sich in die beiden Hauptphasen: Interphase und Teilungsphase. Die Interphase ist durch die Replikation der DNA gekennzeichnet. Sie wird in folgende Phasen unterteilt: In der Ruhephase G₀ und während der präsynthetischen G₁-Phase besitzen die Zellen einen diploiden Chromosomensatz. Auf G₁ folgt die Phase der DNA-Verdopplung – die Synthese-Phase (S). Sie geht in die postsynthetische G₂-Phase über, in der alle Zellen einen reduplizierten Chromosomensatz haben. Die nun folgende Teilungsphase M ist vergleichsweise kurz. Bei der Mitose kommt es zur gleichmäßigen Aufteilung der Chromosomen auf zwei Tochterzellen, die sich dann wiederum in G₀/G₁ befinden. Durch Anfärbung mit einem DNA-spezifischen Farbstoff, dem Propidiumiodid, der an die DNA in einem genauen (stöchiometrischen) Verhältnis bindet, wird der DNA-Gehalt der Einzelzelle durchflußzytometrisch anhand der Fluoreszenzintensität quantifizierbar. Aus der Messung einer Vielzahl von Zellen entsteht das DNA-Histogramm (Abb.4):

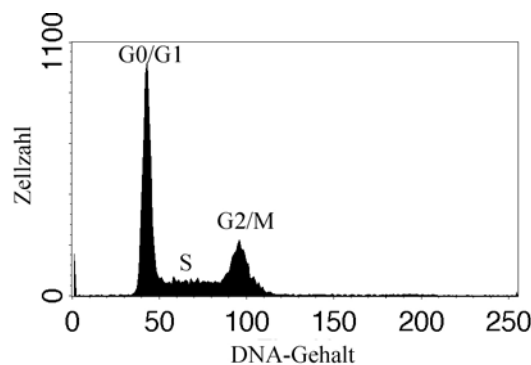


Abbildung 4: Phasen des Zellzyklus im DNA-Histogramm

3.8.2 DNA-Färbung nach Nicoletti

Ein Zeichen der Apoptose ist die DNA-Fragmentierung in oligonukleosomale Einheiten durch spezifische Endonukleasen. Im Histogramm erscheinen diese Zellen mit vermindertem DNA-Gehalt im sogenannten SubG₁-Peak (Abb.5). Bei der Nicoletti-Methode [96] werden die Zellen durch eine hypotone Lösung lysiert, so daß die DNA der Zellkerne der Anfärbung mit Propidiumiodid (PI) direkt zugänglich gemacht wird. Im FACScan Durchflußzytometer werden schließlich die DNA-Gehalte der Zellkerne gemessen.

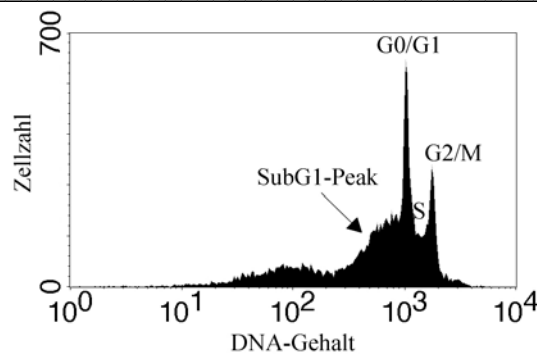


Abbildung 5: SubG1-Peak als Ausdruck von apoptotischer DNA-Fragmentierung

Konfluente Zellen wurden nach Trypsinierung in einer Dichte von 1×10^5 Zellen/Well in 6-Well-Kulturschalen ausgesät. Nach 24h erfolgte die jeweilige Stimulation mit NS-398 bzw. die siRNA-Transfektion (siehe oben). Je nach Meßpunkt wurden die Zellen 24h, 48h oder 72h später geerntet, zentrifugiert (1100Upm, 5min), und der Überstand wurde abgesaugt. Das Pellet versetzte man nach kurzem Vortexen mit 200µl Nicoletti-Reagenz. Die Proben inkubierten 24h bei 4°C im Dunkeln und wurden dann am FACScan gemessen.

3.8.3 BrdU/PI-Labeling

Diese Methode ermöglicht es, durch Bestimmung des Anteils der Zellen, die sich in der DNA-Synthese-Phase (S-Phase) befinden, Aussagen über die Verteilung der Zellen im Zellzyklus zu treffen. Die Zellen werden in Kultur mit Bromodeoxyuridin (BrdU) versetzt, welches bei DNA-Neusynthese in der S-Phase des Zellzyklus anstelle von Thymidin in die DNA eingebaut wird. Ein Fluoreszenzfarbstoff-gekoppelter Antikörper bindet an das BrdU. Danach werden alle Zellen mit Propidiumiodid (PI) angefärbt, um die Gesamtpopulation zu bestimmen. Beide Signale werden im FACScan Durchflußzytometer gemessen (Abb.6).

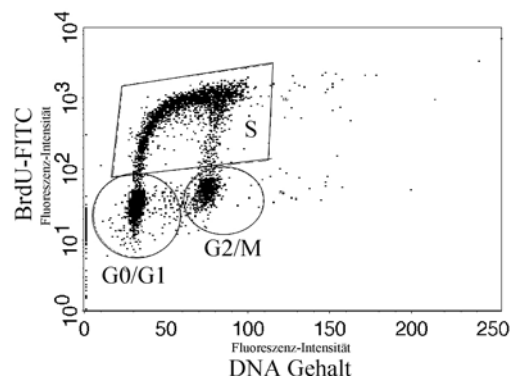


Abbildung 6: Darstellung der S-Phase des Zellzyklus mittels BrdU-Färbung

Konfluente Zellen wurden nach Trypsinierung in einer Dichte von 1×10^5 Zellen/Well in 6-Well-Kulturschalen ausgesät. Nach 24h erfolgte die jeweilige Stimulation mit NS-398 bzw. die siRNA-Transfektion (siehe oben). 30min vor der Ernte (je nach Meßpunkt 24h, 48h oder 72h) wurden die Zellen mit $10 \mu\text{M}$ BrdU versetzt, dann geerntet, zentrifugiert (immer bei 1500Upm, 5min) und der Überstand abgesaugt. Daraufhin wurde das Pellet mit 1xPBS gewaschen, erneut zentrifugiert, abgesaugt und mit Ethanol (-20°C) fixiert. Zwischen allen nun folgenden Schritten wird jeweils das Pellet zuerst zentrifugiert und dann der Überstand abgesaugt. Man resuspendierte das Pellet in 200ml Pepsin ($0,4\text{mg/ml}$ in $0,1\text{M}$ HCl) und inkubierte 30min bei Raumtemperatur. Zur DNA-Denaturierung wurden $200 \mu\text{l}$ 2M HCl zu den Zellen gegeben und 30min bei 37°C inkubiert. Danach wurde das Pellet mit $200 \mu\text{l}$ Borax-Puffer ($0,1\text{M}$ Natriumtetraborat, pH 8,5) resuspendiert und sofort zentrifugiert, wiederum der Überstand abgesaugt und $20 \mu\text{l}$ Anti-BrdU-Antikörper auf das Pellet gegeben. Nach 45minütiger Inkubation im Dunkeln bei Raumtemperatur wurde das Pellet mit PBS ($200 \mu\text{l}$) gewaschen, zentrifugiert, der Überstand abgesaugt. Schließlich wurden die Zellen in Propidiumiodid (10mg/ml PI in 1xPBS) aufgenommen, in ein FACS-Röhrchen überführt und sofort am FACScan gemessen.

3.9 Western Blot

Beim Western Blot handelt es sich um eine Methode zur Proteinanalyse. Nach gelelektrophoretischer Auftrennung der durch Zellyse gewonnenen Proteine, werden diese durch das sogenannte Blotten auf Nitrozellulose-Membranen gebracht. Die Blots werden zunächst mit in Puffer verdünnten Primärantikörpern inkubiert, die an das entsprechende Protein binden. Nach mehrmaligem Waschen werden die Blots in Alkalische-Phosphatase-konjugierten Antikörpern getränkt, die an den Primärantikörper binden. Durch Reaktion der Alkalischen Phosphatase mit Substrat kommt es zur Bildung eines lumineszierenden Stoffes, der einen Film belichtet. Dadurch werden die Proteinbanden sichtbar.

Die Zellen wurden auf Eis in 24-Well-Kulturschalen nach einmaligem Spülen mit 1xPBS mit $25 \mu\text{l}$ Proteinlysispuffer/Well lysiert. Mittels einer Insulinspritze wurde das Zellysat mehrmalig mechanisch zerkleinert und danach bei -20°C gelagert. Die Bestimmung der Proteinkonzentrationen erfolgte mit dem BCA Protein Assay Kit nach Anleitung des Herstellers. Die Proteinproben ($100 \mu\text{g}$) wurden mit Proteinladungspuffer auf $20 \mu\text{l}$ aufgefüllt und für 10min im Thermomixer bei 95°C inkubiert. Anschließend wurden die Proben in einem 10%igen

Polyacrylamidgel aufgetrennt durch SDS-PAGE-Gelelektrophorese bei 90-100V mit einer Laufzeit von ca. 90min. Es erfolgte das „Blotten“ der Proteine auf eine Nitrozellulosemembran in einem Semi-Dry-System bei 100mA für 90min. Zur Blockierung unspezifischer Bindungsstellen inkubierte der Blot für 2h bei Raumtemperatur in Blocking-Puffer. Die monoklonalen Primärantikörper wurden in Blocking-Puffer verdünnt (COX-1, COX-2, β -Aktin: 1:1000) für 24h bei 4°C auf die Membran gegeben. Nach anschließendem dreimaligen Waschen mit Waschpuffer erfolgte die 45-minütige Inkubation mit dem 1:5000 in Blocking-Puffer verdünnten sekundären anti-mouse Antikörper, gekoppelt mit Alkalischer Phosphatase, für 45min. Nach nochmaligem Waschen und 2x2min Inkubation mit Assay-Puffer reagierten die Banden für 5min mit dem CDP-Star RTU Lumineszenzsystem und belichteten einen Hyperfilm.

3.10 Signifikanztestung

Die Signifikanz wurde mit dem t-Test nach Student überprüft. Als Signifikanzschwelle wurde 5% Irrtumswahrscheinlichkeit ($p < 0,05$) gewählt.

Zusätzlich wurde die Signifikanz mit dem Lord-Test [97] überprüft. Dieser Test ist besonders geeignet für Versuche mit sehr kleinen Stichproben, wie es oft in Zellkulturexperimenten üblich ist. Die Verwendung des t-Tests ist dafür eher weniger geeignet, da er sich auf die Standardabweichung bezieht, welche erst bei größerer Anzahl an Meßwerten sinnvoll bestimmt werden kann. Der Lord-Test dagegen nimmt die Spannweite (Differenz aus Maximum und Minimum einer Meßreihe) als Fehlermaß. Die Normalverteilung wird vorausgesetzt. Für den Vergleich zweier unabhängiger Meßreihen gleichen Umfangs bestimmt man die Prüfgröße

$\hat{u} = \frac{|\bar{x}_1 - \bar{x}_2|}{(R_1 + R_2)/2}$ als den Quotienten aus der Differenz der Durchschnitte (\bar{x}_1, \bar{x}_2) und dem

arithmetischen Mittel der Spannweiten (R_1, R_2) beider Reihen. Nach Lord kann dann anhand einer Tabelle [98] bestimmt werden, ob die Nullhypothese abgelehnt werden kann. Bei zweiseitiger Fragestellung und einem Stichprobenumfang von $n=3$ kann auf dem 5%-Niveau die Nullhypothese abgelehnt werden, wenn $\hat{u} > 1,272$ und bei einseitiger Fragestellung, wenn $\hat{u} > 0,974$.

4 Ergebnisse

Für die vorliegenden Versuche wurden mit OVCAR-3 und SKOV-3 zwei Zelllinien des epithelialen Ovarialkarzinoms ausgewählt, die exemplarisch für COX-2-positive und COX-2-negative Tumoren stehen. Im Rahmen eines vorausgegangenen Projekts der Arbeitsgruppe war bereits gezeigt worden, daß die OVCAR-3-Zellen durch IL-1 β -Stimulation (10ng/ml) ihre COX-2-Expression hochregulieren [8] (vgl. auch 4.1.3:Abb.12). Dagegen konnte bei SKOV-3 keine COX-2-Expression nachgewiesen werden.

4.1 Beeinflussung der Zellproliferation durch Cyclooxygenase-2-Inhibition

In dieser Arbeit sollen zwei Methoden der COX-2-Inhibition miteinander verglichen werden:

1. Die Hemmung des aktiven COX-2-Proteins durch den selektiven Inhibitor NS-398.
2. Die Hemmung der COX-2-mRNA durch die Transfektion mit COX-2-siRNA (vgl. 3.6).

4.1.1 Einfluß von NS-398 auf die Proliferation

In den beiden Zelllinien OVCAR-3 und SKOV-3 wurde der Einfluß des selektiven COX-2-Inhibitors NS-398 auf die Proliferation jeweils mit und ohne IL-1 β -Stimulation der COX-2-Expression im XTT-Test untersucht. NS-398 bewirkte stets eine dosisabhängige Proliferationshemmung (Abb.7). Dabei erreichte OVCAR-3 signifikante Unterschiede in der Proliferation im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle ab 50 μ M NS-398 (\hat{u} =1,28; p =0,011) bzw. 10 μ M NS-398/IL-1 β (\hat{u} =1,89; p =0,0001). SKOV-3 unterschied sich signifikant von der Kontrolle ab einer Inhibitorkonzentration von 100 μ M NS-398 (\hat{u} =3,49; p =7,5*10⁻⁶) bzw. 50 μ M NS-398/IL-1 β (\hat{u} =2,84; p =0,003). Bei SKOV-3 sind im Vergleich zu OVCAR-3 leicht höhere Inhibitorkonzentrationen notwendig, um eine signifikante Proliferationshemmung zu erzielen. Unter IL-1 β -Stimulation verringerte sich in beiden Zelllinien die zum Erreichen des Signifikanzniveaus notwendige NS-398-Konzentration.

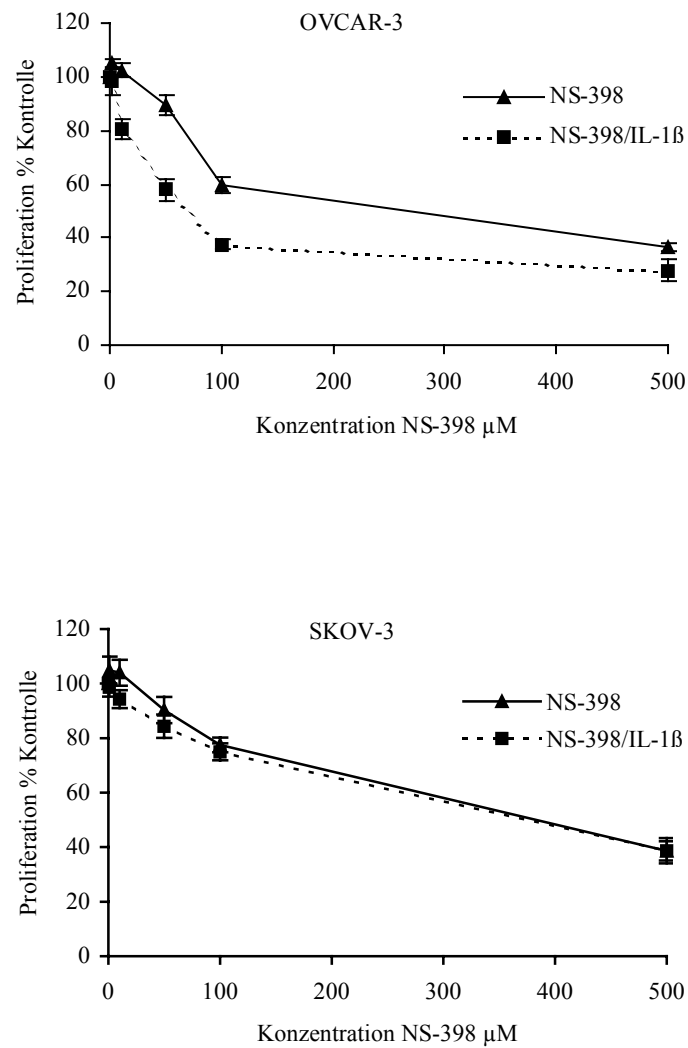


Abbildung 7: Zellwachstumskurven, dargestellt in Prozent der Kontrolle für zwei Ovarialkarzinomzelllinien nach Behandlung mit verschiedenen Konzentrationen von NS-398 (1 μM -500 μM) für 72h, unstimuliert oder unter COX-2-Stimulation durch IL-1 β (10ng/ml). Ergebnisse (Mittelwert und Standardfehler des Mittelwertes) aus drei unabhängigen Experimenten mit je Vierfachansätzen.

Um sicherzustellen, daß die Proliferationshemmung allein auf die Wirkung von NS-398 zurückzuführen ist, und nicht durch eventuelle Effekte des Lösungsmittels DMSO verursacht wird, wurde eine DMSO-Konzentrationsreihe aufgestellt.

Das Lösungsmittel DMSO zeigte keine Auswirkung auf die Proliferation (Abb.8). Gleiche Ergebnisse wurden auch ohne IL-1 β -Stimulation erzielt (nicht dargestellt).

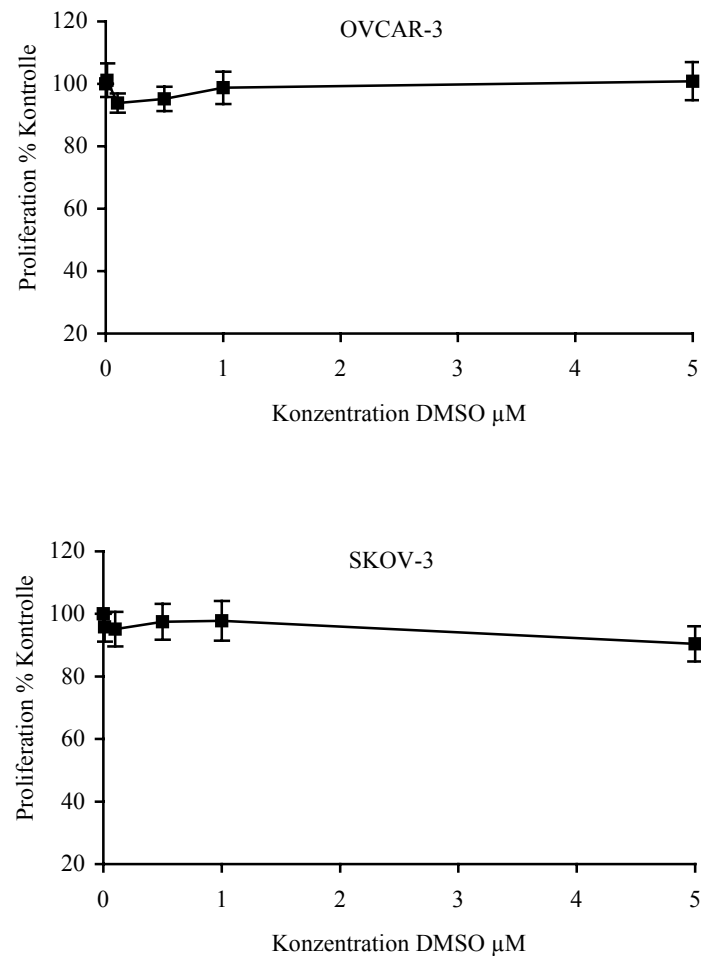


Abbildung 8: Einfluß des NS-398-Lösungsmittels DMSO auf die Proliferation unter COX-2-Stimulation mit IL-1 β (10ng/ml). Die höchste DMSO-Konzentration (5 μ M) entspricht der höchsten NS-398-Konzentration in allen gezeigten Experimenten (500 μ M). Ergebnisse (Mittelwert und Standardfehler des Mittelwertes) aus drei unabhängigen Experimenten mit je Vierfachansätzen.

Inhibition der PGE2-Produktion durch NS-398

Es sollte untersucht werden, bei welcher NS-398-Konzentration die Cyclooxygenase-2 in den OVCAR-3-Zellen inhibiert ist. Da PGE2 in den OVCAR-3 hauptsächlich von der COX-2 hergestellt wird (vgl. 4.1.3:Abb.14), gilt es als guter Indikator für die vorhandene Menge an aktiver COX-2. Somit wurde zur Überprüfung der COX-2-Funktion die Menge an PGE2 im Medium-Überstand der Zellen mittels eines PGE2-ELISA bestimmt.

Bei unbehandelten OVCAR-3-Zellen läßt sich eine PGE2-Produktion kaum nachweisen (Abb.9), die Meßwerte liegen unterhalb der Nachweisgrenze. Daher wurden die Messungen sowohl von der Kontrolle als auch von den mit NS-398 behandelten Zellen unter IL-1 β -Stimulation (24h) und somit im gut meßbaren PGE2-Level-Bereich durchgeführt.

Unter IL-1 β -Stimulation kam es zu einem deutlichen Anstieg der PGE2-Menge im Vergleich zur Kontrolle ohne IL-1 β . Dies ist auf die auch im Western Blot (4.1.3:Abb.12) beobachtete Induktion der COX-2 durch IL-1 β zurückzuführen. Es konnte weiterhin gezeigt werden, daß bereits bei einer Konzentration von 1 μ M NS-398 die PGE2-Produktion und somit die COX-2 in den OVCAR-3-Zellen vollständig gehemmt ist (Abb.9).

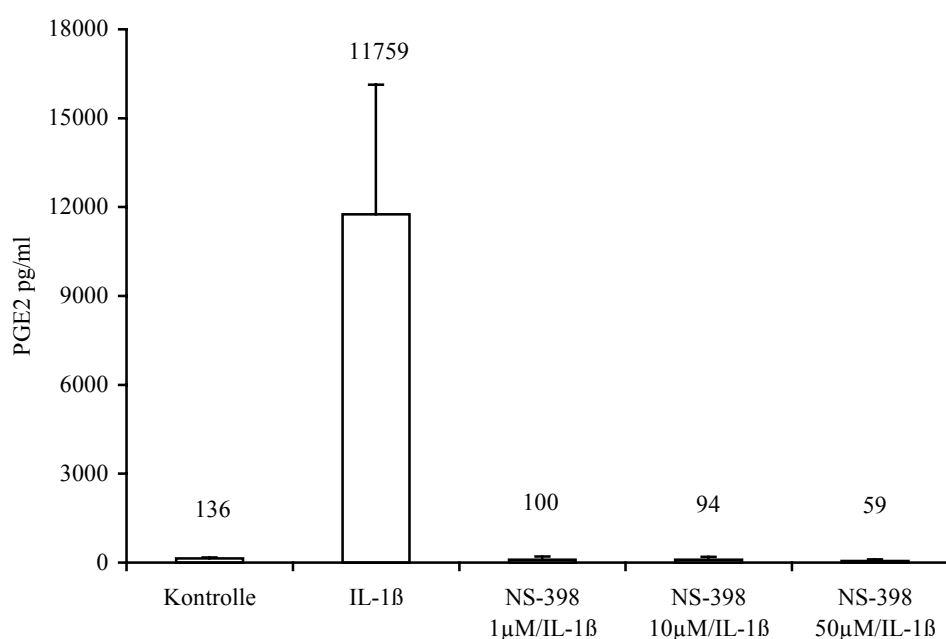


Abbildung 9: Produktion von PGE2 in OVCAR-3. Die Zellen wurden 48h mit verschiedenen Konzentrationen NS-398 (1 μ M-50 μ M) inkubiert und 24h vor Abnahme der Überstände mit IL-1 β (10ng/ml) stimuliert. Ergebnisse (Mittelwert und Standardabweichung) von drei unabhängigen Experimenten.

PGE2-Einfluß auf die Proliferationshemmung durch NS-398

Weiterhin wurde der Einfluß von PGE2 auf den proliferationshemmenden Effekt von NS-398 und dessen Reversibilität untersucht. Als PGE2-Konzentration wurden 10µM in Anlehnung an Ming Li et al. [60] gewählt, da mit dieser Konzentration die Apoptoseinduktion durch NS-398 in Ösophaguskarzinomzellen antagonisiert werden konnte.

In der vorliegenden Untersuchung war die durch NS-398 bewirkte Proliferationshemmung weder in OVCAR-3 noch in SKOV-3 durch PGE2-Gabe reversibel (Abb.10).

Allerdings konnte durch PGE2 in den Kontrollen eine Proliferationssteigerung bewirkt werden. Insbesondere bei SKOV-3 zeigten die mit PGE2 behandelten Zellen eine 30%ige Zunahme der Proliferation gegenüber den unbehandelten Zellen ($\hat{u}=1,41$; $p=0,002$). Auch bei OVCAR-3 fand sich ein geringer, nur im t-Test signifikanter proliferationsfördernder Effekt ($p=0,006$).

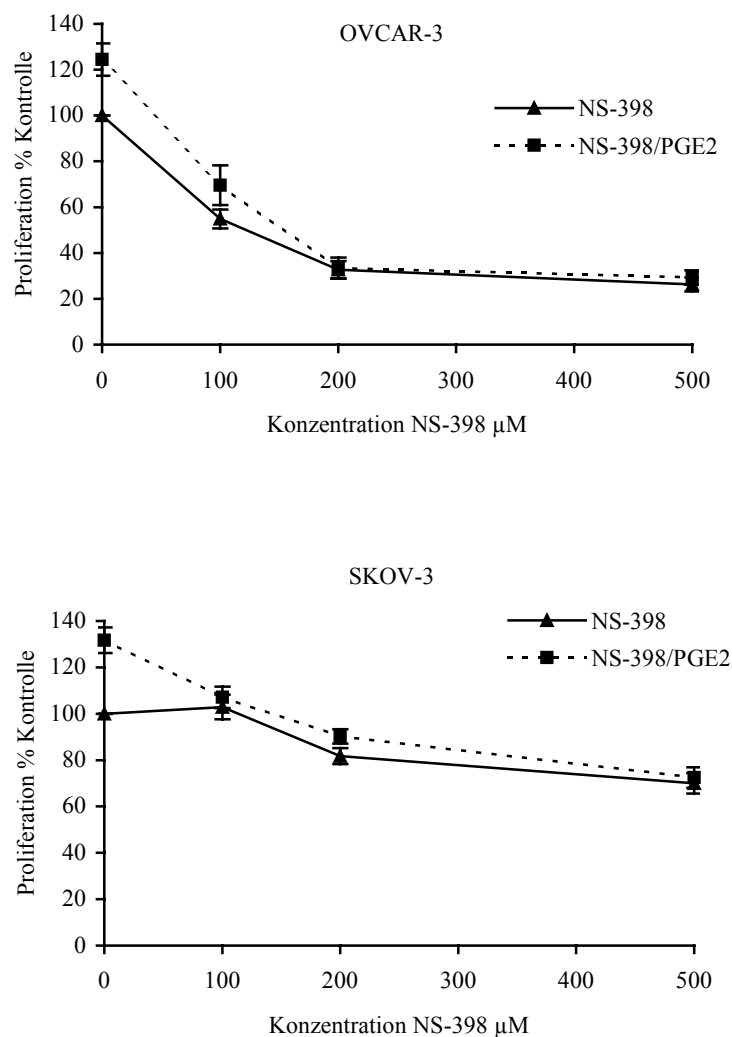


Abbildung 10: Zellwachstumskurven, dargestellt in Prozent der Kontrolle für zwei Ovarialkarzinomzelllinien, nach Behandlung mit verschiedenen Konzentrationen von NS-398 (100-500 μM) für 72h, mit und ohne PGE2-Zugabe (10 μM). Ergebnisse (Mittelwert und Standardfehler des Mittelwertes) aus drei unabhängigen Experimenten mit je Vierfachansätzen.

4.1.2 Einfluß von Indomethacin auf die Proliferation

Viele Autoren konnten mit dem Einsatz unselektiver Cyclooxygenase-Inhibitoren gleiche Ergebnisse erzielen wie mit COX-2-spezifischer Hemmung. Daher wurde auch in dieser Arbeit der Proliferationseinfluß von Indomethacin, einem unspezifischer Inhibitor von COX-1 (IC_{50} 0,013 μM) und COX-2 (IC_{50} 1,0 μM) [15] untersucht. Die Proliferation von OVCAR-3 und SKOV-3 konnte ebenfalls dosisabhängig gehemmt werden (Abb.11).

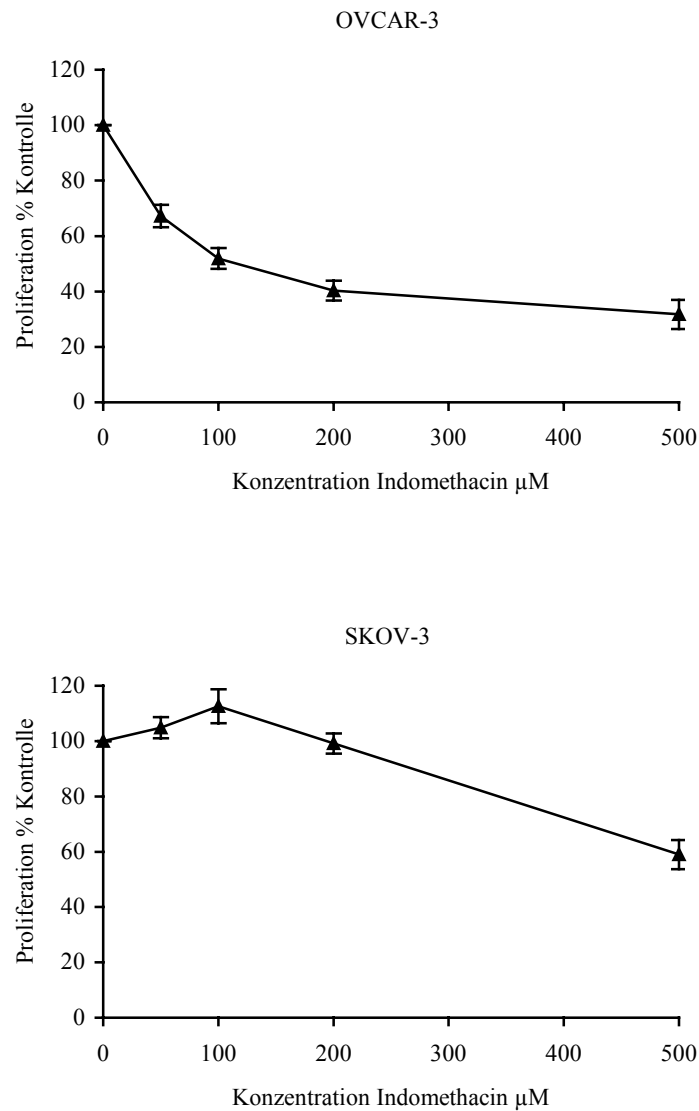


Abbildung 11: Zellwachstumskurven, dargestellt in Prozent der Kontrolle für zwei Ovarialkarzinomzelllinien, nach Behandlung mit verschiedenen Konzentrationen von Indomethacin (50-500 μM) für 72h. Ergebnisse (Mittelwert und Standardfehler des Mittelwertes) aus mindestens drei unabhängigen Experimenten.

Dabei zeigt SKOV-3 (signifikant bei 500 μM Indomethacin, $\hat{u}=2,03$; $p=8,7 \cdot 10^{-6}$) im Vergleich zu OVCAR-3 (signifikant bei 50 μM Indomethacin, $\hat{u}=16,02$; $p=9,3 \cdot 10^{-12}$) erst bei wesentlich höheren Konzentrationen ein vermindertes Wachstum. Eine geringere Empfindlichkeit der SKOV-3 war auch bereits bei der Gabe von NS-398 (vgl. 4.1.1) beobachtet worden.

4.1.3 Proliferationseinfluß von COX-1- und COX-2-siRNA

Die OVCAR-3-Zellen wurden mit COX-1-siRNA, COX-2-siRNA und mit Lamin A/C-siRNA als Kontrolle transfiziert.

Die COX-1 wurde aus folgendem Grund mituntersucht: In vorausgegangenen Untersuchungen zur Apoptoseinduktion durch COX-2-Inhibitoren in Tumorzelllinien konnte die Apoptose meist nur durch vielfach höhere Konzentrationen als die zur Inhibition der COX-2 benötigten (vgl. 1.1.7:Tab.4) induziert werden. Da bei hohen Konzentrationen von COX-2-Inhibitoren auch die COX-1 unselektiv gehemmt wird (vgl. 1.1.4), wurde die COX-1 als potentiell Target ebenfalls in Betracht gezogen.

Die Funktionsfähigkeit der COX-2-siRNA konnte im Western Blot gezeigt werden: Es war nach Transfektion und 72-stündiger Inkubation keine COX-2-Bande mehr nachweisbar (Abb.12). Da die Funktionsfähigkeit der COX-2-siRNA auch im PGE2-ELISA nachgewiesen werden konnte (vgl. Abb.14) und in der Arbeitsgruppe bereits ausgiebig in mehreren Western Blots getestet worden war [95], wurde hier auf weitere Western Blots verzichtet.

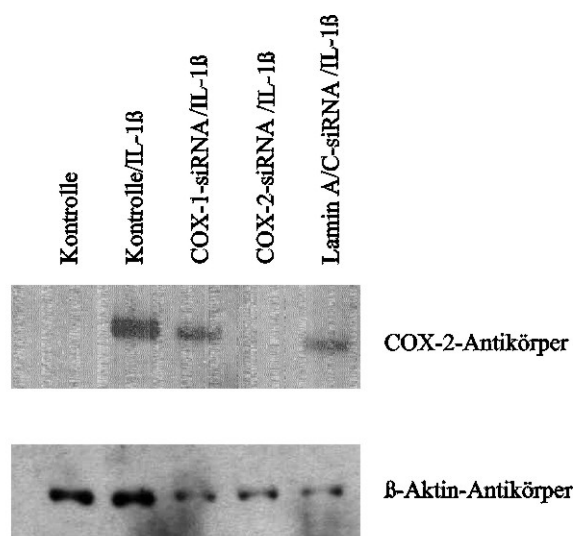


Abbildung 12: Western Blot: COX-2-Expression in OVCAR-3 nach COX-2-siRNA-Transfektion. Als Transfektionskontrolle diente Lamin A/C-siRNA. Inkubation für 72h und Stimulation mit IL-1β (10ng/ml) 24h vor der Zellernte. Der β-Aktin-Antikörper wurde als Western Blot Kontrolle benutzt zum Vergleich der jeweils aufgetragenen Proteinmengen.

Nach 72h Inkubation mit der jeweiligen siRNA wurde die Proliferation der Zellen im XTT-Test bestimmt. Um den durch den Vorgang der Transfektion ausgelösten Streß zu berücksichtigen, wurde Lamin A/C-siRNA in der höchsten siRNA-Konzentration von 60pM als Kontrolle eingesetzt. Dabei ergaben sich keine signifikanten Unterschiede in der Proliferation zwischen COX-1- und COX-2-siRNA zur Lamin A/C-siRNA-Transfektionskontrolle, während die Proliferation der mit NS-398 behandelten Zellen analog zu den Ergebnissen von 4.1.1. abnahm (Abb.13).

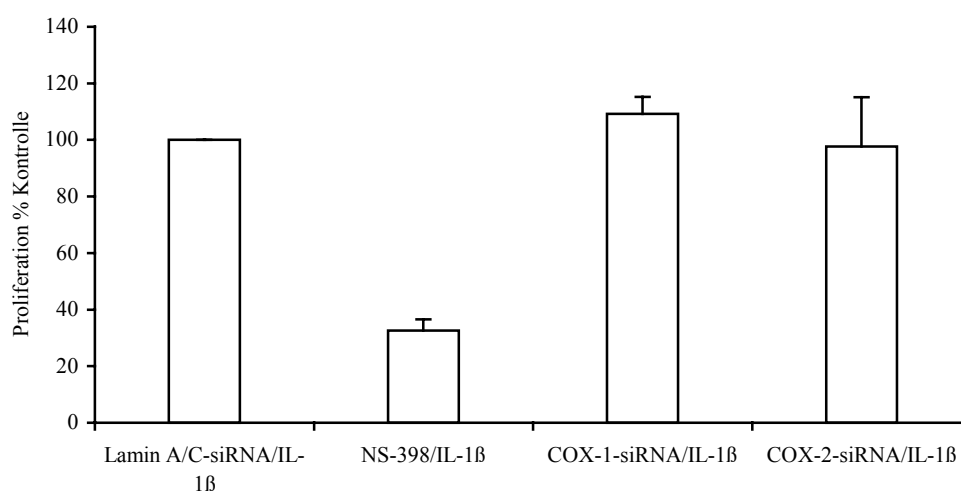


Abbildung 13: Zellwachstum, dargestellt in Prozent der Kontrolle für OVCAR-3 nach Transfektion mit COX-1-, COX-2- und Lamin A/C-siRNA (jeweils 60pM) und Inkubation mit NS-398 (200μM) für 72h, mit IL-1β-Stimulation (10ng/ml) Ergebnisse (Mittelwert und Standardabweichung) aus drei unabhängigen Experimenten.

Es wurde weiterhin untersucht, ob die Wachstumshemmung von NS-398 ebenfalls auftritt, wenn durch die siRNA die COX-1 bzw. COX-2 bereits ausgeschaltet sind, also die potentiellen Targets des Medikamentes nicht vorhanden bzw. stark reduziert vorhanden sind. Dabei konnten im XTT-Test gleichermaßen verstärkte Abnahmen der Zellzahl durch NS-398-Gabe sowohl bei siRNA-transfizierten als auch bei nicht transfizierten Zellen beobachtet werden (Ergebnisse nicht dargestellt).

PGE2-Synthese bei der COX-2-Ausaltung durch siRNA

Dazu wurde nach siRNA-Transfektion mit COX-1-siRNA und COX-2-siRNA die PGE2-Produktion unter IL-1 β -Stimulation gemessen. Als Kontrolle dienten Zellen, die nur mit dem Transfektionsreagenz Oligofectamin behandelt wurden.

Es zeigte sich eine 60prozentige Reduktion der PGE2-Produktion bei den COX-2-siRNA-transfizierten Zellen (Abb.14). Die COX-1-siRNA-Transfektion hat keinen Einfluß auf die PGE2-Produktion.

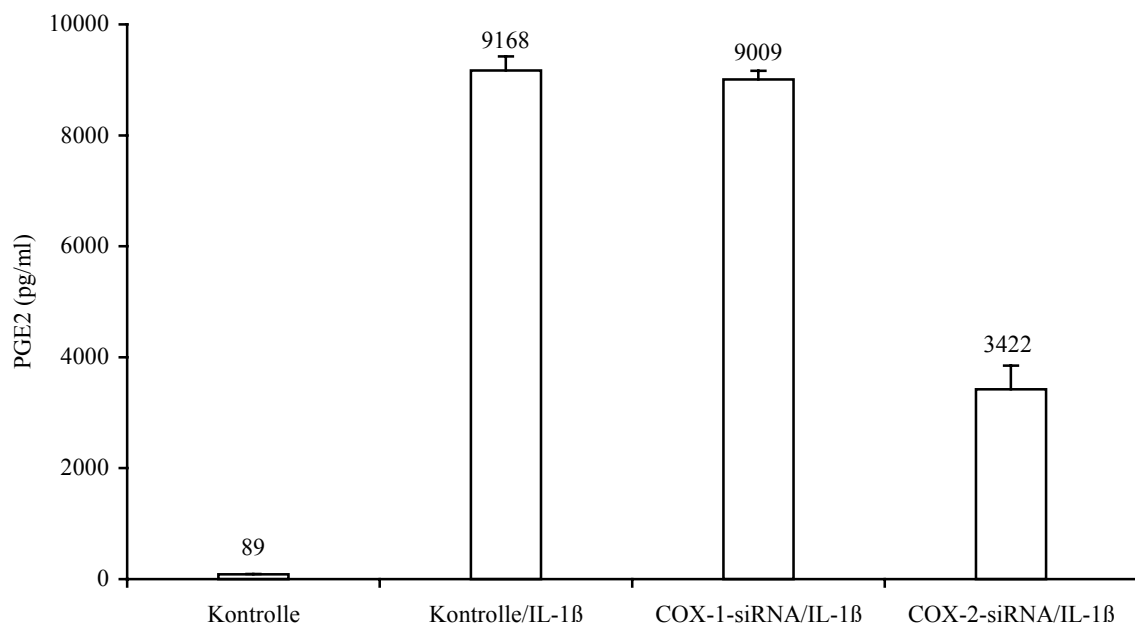


Abbildung 14: Produktion von PGE2 bei OVCAR-3. Die Zellen wurden 72h mit der jeweiligen siRNA (60pM) bzw. als Kontrolle Oligofectamin inkubiert und 24h vor Abnahme der Überstände mit IL-1 β (10ng/ml) stimuliert. Ergebnisse (Mittelwerte und Standardabweichungen) von drei unabhängigen Experimenten.

4.2 Beeinflussung der Apoptose durch Cyclooxygenase-2-Inhibition

4.2.1 Einfluß von NS-398 auf die Apoptose

Die Frage, ob durch NS-398 in den untersuchten Zelllinien Apoptose induziert wird, soll im folgenden untersucht werden: Dazu wurde durchflußzytometrisch sowohl mit der Nicoletti-Färbung als auch mit der Annexin V/PI-Färbung bei OVCAR-3- und SKOV-3-Zellen nach 72stündiger Inkubation mit NS-398 jeweils mit und ohne IL-1 β -Stimulation der prozentuale Zelltod gemessen. Bei dieser Bestimmung werden sowohl die im Medium-Überstand schwimmenden als auch die adhärennten Zellen erfaßt. Dies ist wichtig, weil die apoptotischen bzw. nekrotischen Zellen den Kontakt zu den vitalen Zellen verlieren und dann im Medium-Überstand frei flottieren.

Als Konzentration von NS-398 wurden 200 μ M eingesetzt, da bei dieser Konzentration im XTT-Test (vgl. 4.1.1) in beiden Zelllinien eine deutliche Reduktion der Zellproliferation auftrat.

Apoptosemessung mit der Nicoletti-Färbung

Mit der Nicoletti-Methode war in beiden Zelllinien bei Gabe von bis zu 200 μ M NS-398 ohne IL-1 β -Stimulation keine Apoptose meßbar. Es gab keinen SubG1-Peak als Ausdruck von apoptotischer DNA-Fragmentierung (vgl. 3.8.2). Allerdings war der Prozentsatz toter Zellen bei gleichzeitiger Gabe von NS-398 (200 μ M) und IL-1 β in beiden Zelllinien etwas erhöht (Abb.15).

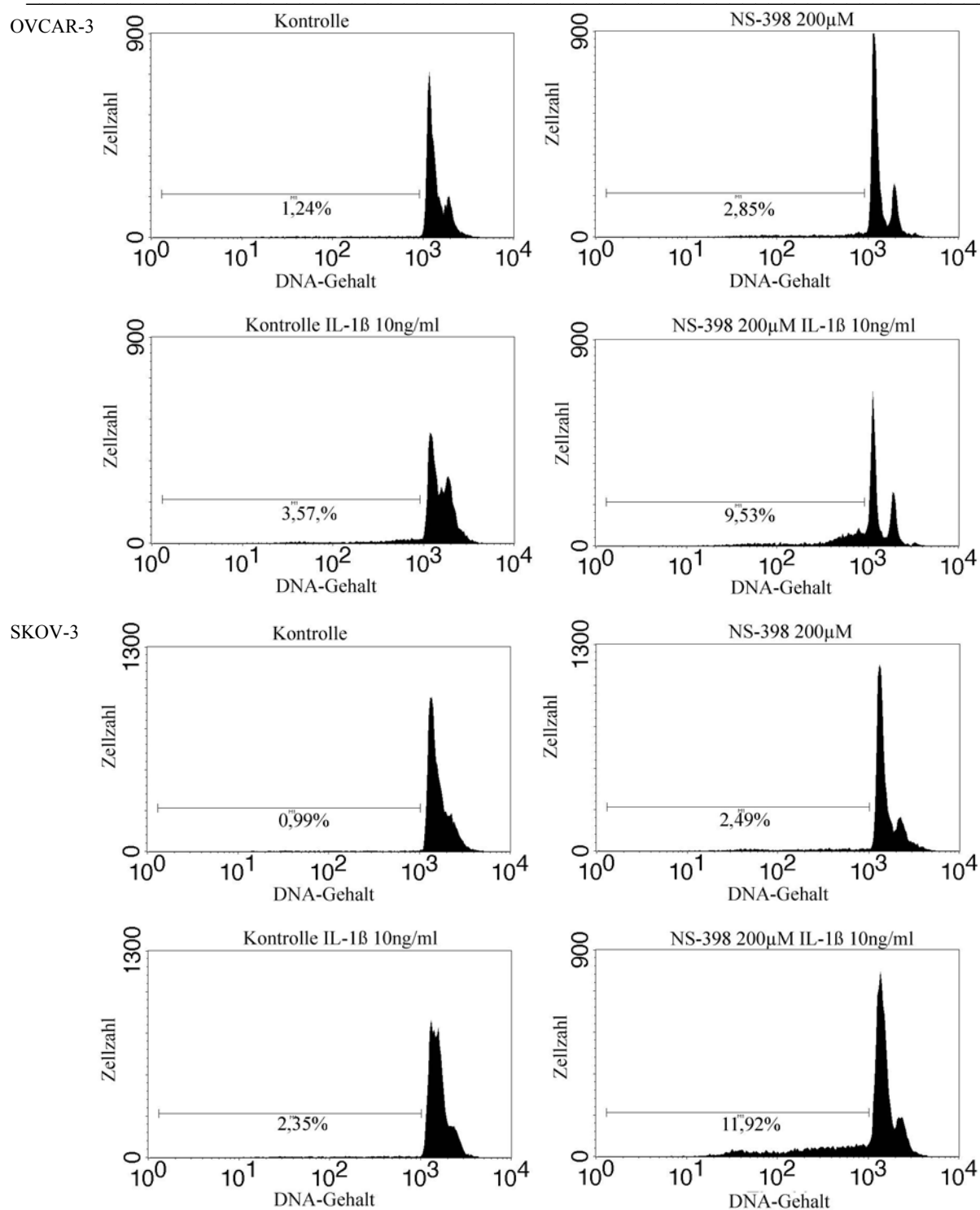


Abbildung 15: Nicoletti-Färbung und durchflußzytometrische Bestimmung von OVCAR-3 und SKOV-3 nach 72h Behandlung mit NS-398 (200μM) bzw. NS-398 und IL-1β (10ng/ml). Der Zelltod wird angegeben in Prozent (unter dem Balken) aller gemessenen Zellen. Darstellung eines repräsentativen Experiments von drei Experimenten.

Apoptosemessung mit der Annexin V/PI-Färbung

Die Bestimmung der Apoptose mit der Annexin/PI-Färbung ist auch unter einem anderen Aspekt wichtig: Mit der Färbung läßt sich zwischen apoptotischem und nekrotischem Zelltod unterscheiden (vgl. 3.8.1).

Es konnte weder bei OVCAR-3 noch bei SKOV-3 vermehrte Apoptose bei Gabe von NS-398 mit und ohne IL-1 β -Stimulation nachgewiesen werden (Abb.16).

Es wurde durch NS-398 (bis 200 μ M) ohne IL-1 β in beiden Zelllinien auch keine vermehrte Nekrose beobachtet.

IL-1 β jedoch führte in OVCAR-3 zu meßbarer Nekrose: Es zeigte sich bei OVCAR-3 unter IL-1 β -Stimulation bereits in der Kontrolle eine signifikante Zunahme der Nekrose (\hat{u} =6,29; p =0,009) auf 22% gegenüber unbehandelten Zellen (5%).

Im Unterschied zu der alleinigen NS-398-Behandlung der Zellen, die keine Veränderungen der Zellvitalität zur Folge hatte, gab es in der Kombination von 200 μ M NS-398 mit IL-1 β in beiden Zelllinien eine deutliche Zunahme vor allem des nekrotischen Zelltods: In den OVCAR-3-Zellen steigt die Rate an nekrotischem Zelltod auf 57% gegenüber der IL-1 β -Kontrolle (22%) bei zusätzlicher Gabe von 200 μ M NS-398 (\hat{u} =2,78; p =0,039). Auch in SKOV-3 steigt der Anteil nekrotischer Zellen bei Gabe von 200 μ M NS-398 in Kombination mit IL-1 β auf 35% gegenüber 14% in den nur mit IL-1 β behandelten Zellen, wobei das Signifikanzniveau deutlich erreicht wird (\hat{u} =1,62; p =0,0008). Bei 50 μ M NS-398/IL-1 β treten dagegen in beiden Zelllinien noch keine signifikanten Veränderungen gegenüber den nur mit IL-1 β behandelten Zellen auf.

Auf die bereits von anderen Autoren beschriebenen zytotoxischen Effekte von IL-1 β soll im Rahmen der Diskussion dieser Arbeit (5.1.3) näher eingegangen werden.

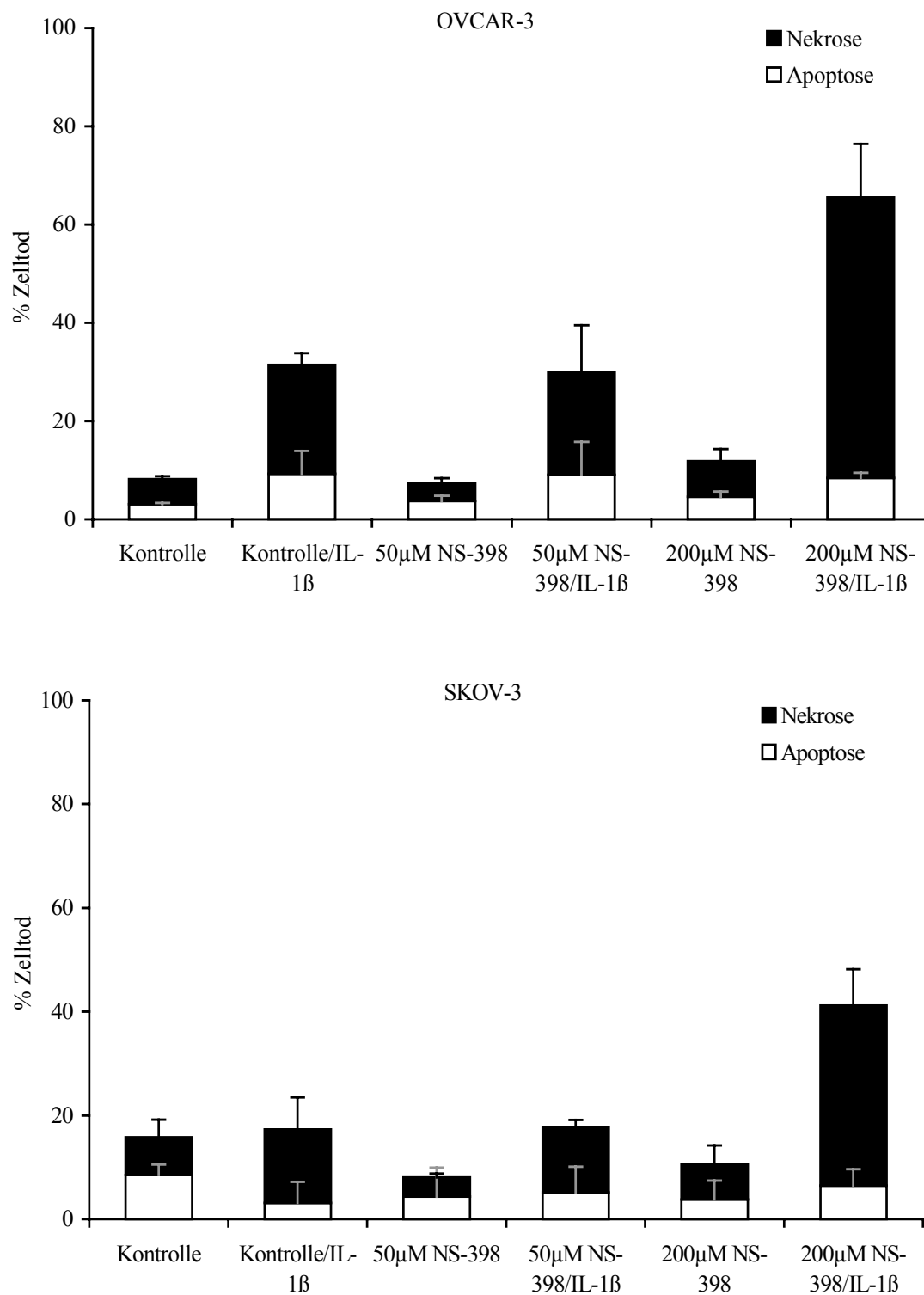


Abbildung 16: Zelltod in % bei OVCAR-3 und SKOV-3 nach Behandlung mit NS-398 (50 μ M und 200 μ M) und NS-398 mit IL-1 β -Stimulation (10ng/ml) für 72h. Der Zelltod wurde mit der Annexin V/PI-Färbung bestimmt. Als Kontrolle diente das NS-398-Lösungsmittel DMSO in der höchsten Inhibitor-Konzentration. Die dargestellten Ergebnisse sind Mittelwerte und Standardabweichungen aus drei unabhängigen Experimenten.

4.2.2 Einfluß auf die Apoptose durch COX-1-, COX-2-siRNA

Analog zu den Apoptosebestimmungen bei der COX-2-Inhibition durch NS-398 wurde der Einfluß von der COX-2-Ausschaltung durch RNA-Interferenz auf die Apoptose bei OVCAR-3 mittels Nicoletti- und Annexin V/PI-Färbung bestimmt. Die SKOV-3-Zellen wurden nicht untersucht, da diese Zellen COX-2-negativ sind.

In beiden Verfahren zur Apoptosemessung konnte bei den mit COX-1- bzw. COX-2-siRNA transfizierten OVCAR-3-Zellen im Vergleich zur Transfektionskontrolle mit Lamin A/C-siRNA keine vermehrte Apoptose festgestellt werden (Abb.17;18). Auch die Co-Transfektion mit COX-1- und COX-2-siRNA führte nicht zu vermehrter Apoptose oder Nekrose.

Die Grundapoptoserate in der Kontrolle (gemessen mit der Nicoletti-Färbung) liegt jedoch im Vergleich zu unbehandelten Zellen (vgl. 4.2.1) bereits bei 10% vermutlich aufgrund der Toxizität des Transfektionsreagenzes (Abb.17). Im Annexin V/PI-Assay ist die Zahl PI-positiver Zellen im oberen linken Quadranten bereits bei der Transfektionskontrolle 15%, was ebenfalls für eine nekrotisch-toxische Schädigung durch den Vorgang der Transfektion spricht (Abb.18).

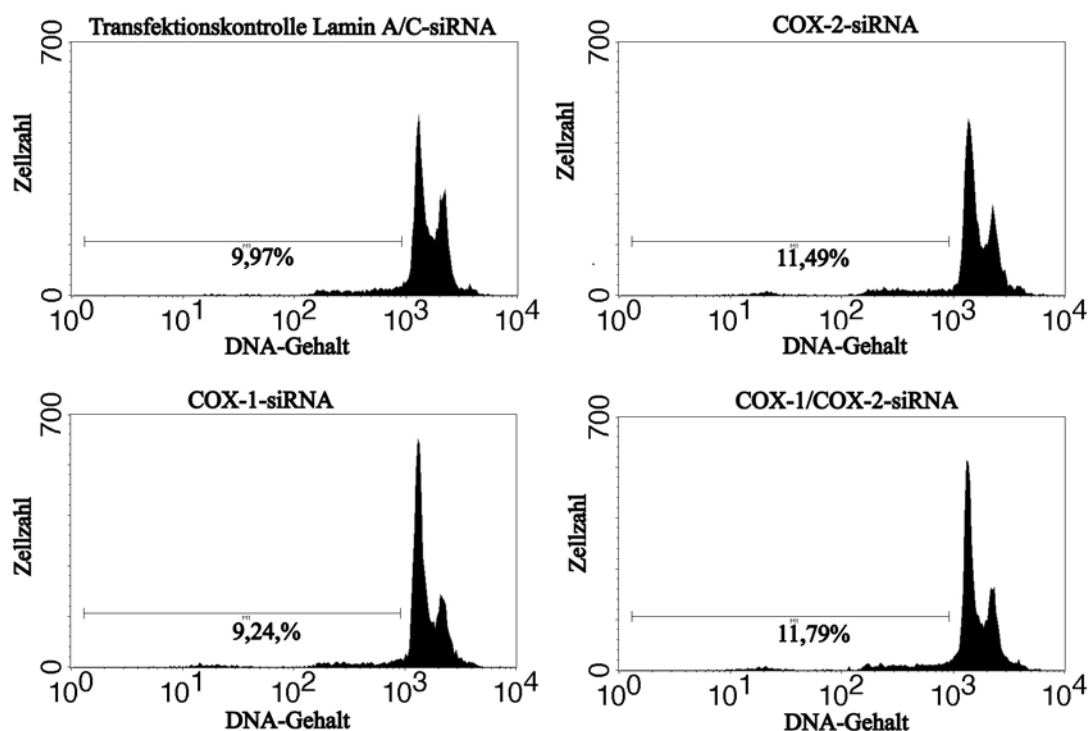


Abbildung 17: Auswirkung der siRNA-Transfektion auf die Apoptose. OVCAR-3 wurden für 48h mit der Transfektionskontrolle Lamin A/C-siRNA, COX-1-siRNA, COX-2-siRNA (je 60pM) bzw. COX-1/COX-2-siRNA (je 30pM) inkubiert, mit der Nicoletti-Methode aufbereitet und durchflußzytometrisch bestimmt. Die Apoptoserate ist unterhalb des Markers in Prozent dargestellt. Gezeigt ist ein repräsentatives Experiment von drei unabhängigen Experimenten.

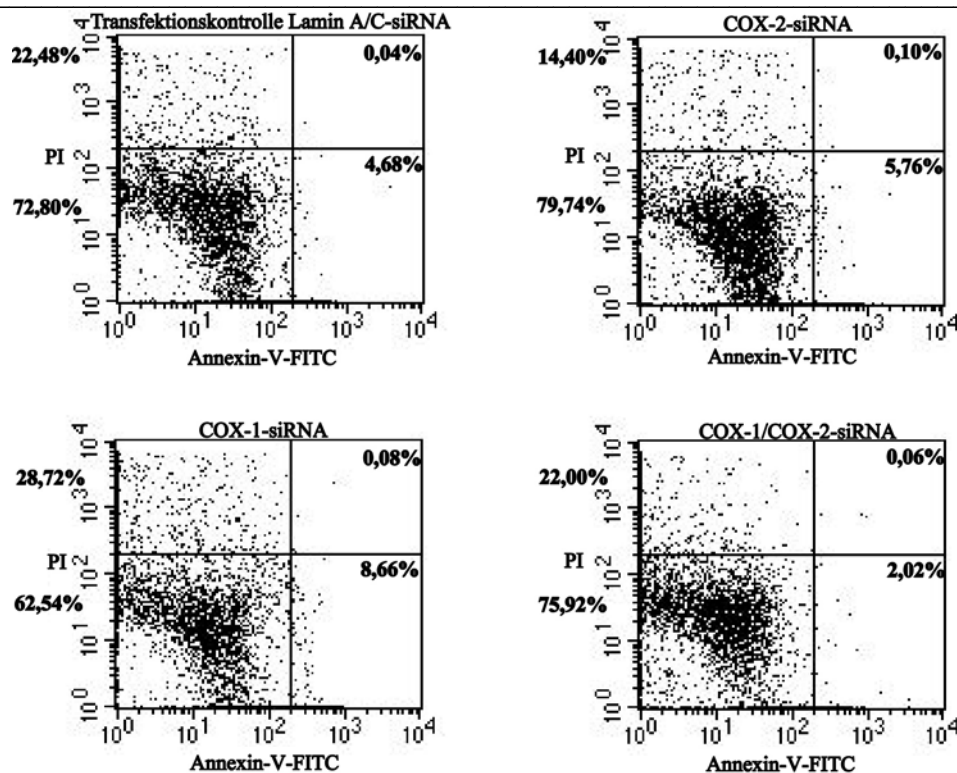


Abbildung 18: Auswirkung der siRNA-Transfektion auf die Apoptose. OVCAR-3 wurden für 48h mit der Transfektionskontrolle Lamin A/C-siRNA, COX-1-siRNA, COX-2-siRNA (je 60pM) bzw. COX-1/COX-2-siRNA (je 30pM) inkubiert, mit Annexin V-FITC/PI gefärbt und durchflußzytometrisch bestimmt. Die Apoptoserate ist innerhalb bzw. neben den Quadranten in Prozent dargestellt. Ein repräsentatives Experiment von drei unabhängigen Experimenten mit 48-72h-Inkubation.

4.3 COX-2-Inhibition - Einfluß auf den Zellzyklus

4.3.1 Einfluß von NS-398 auf den Zellzyklus

Die in den XTT-Tests (vgl. 4.1.1) gezeigte Abnahme der Zellproliferation unter NS-398-Gabe läßt eine Arretierung des Zellzyklus vermuten, da sich keine Hinweise auf apoptotische oder nekrotische Zellschädigungen durch NS-398 (ohne IL-1 β) als Ursache für die verminderte Zellzahl finden ließen (vgl. 4.2.1).

Mit der Nicoletti-Methode konnte in beiden untersuchten Zelllinien durchflußzytometrisch ein Anwachsen des G1-Peaks mit steigender Konzentration von NS-398 festgestellt werden (Abb.19). Dies deutete auf einen G0/G1-Arrest des Zellzyklus hin. Dazu wurden die Peaks mit der Software ModFit analysiert, und die Vermutung des G0/G1-Arrestes konnte sowohl in OVCAR-3 als auch in SKOV-3 bestätigt werden (Tab.5).

Diese 10-15prozentige Zunahme der in der G0/G1-Phase befindlichen Zellen nach NS-398-Gabe trat sowohl unter IL-1 β -Stimulation als auch ohne Zytokingabe auf. Insgesamt war das Niveau des G1-Arrestes unter NS-398 ohne IL-1 β -Stimulation in den OVCAR-3-Zellen höher als bei SKOV-3. OVCAR-3 lag aber auch in den Kontrollen bereits auf einem höheren G1-Niveau. In der NS-398/IL-1 β -Kombination dagegen zeigte SKOV-3 einen stärkeren G1-Arrest als OVCAR-3. In 4.2.1 war bereits gezeigt worden, daß die OVCAR-3 auf diese Stimulation mit einer starken Zunahme an nekrotischem Zelltod reagieren. Bei den SKOV-3 fiel diese Wirkung schwächer aus.

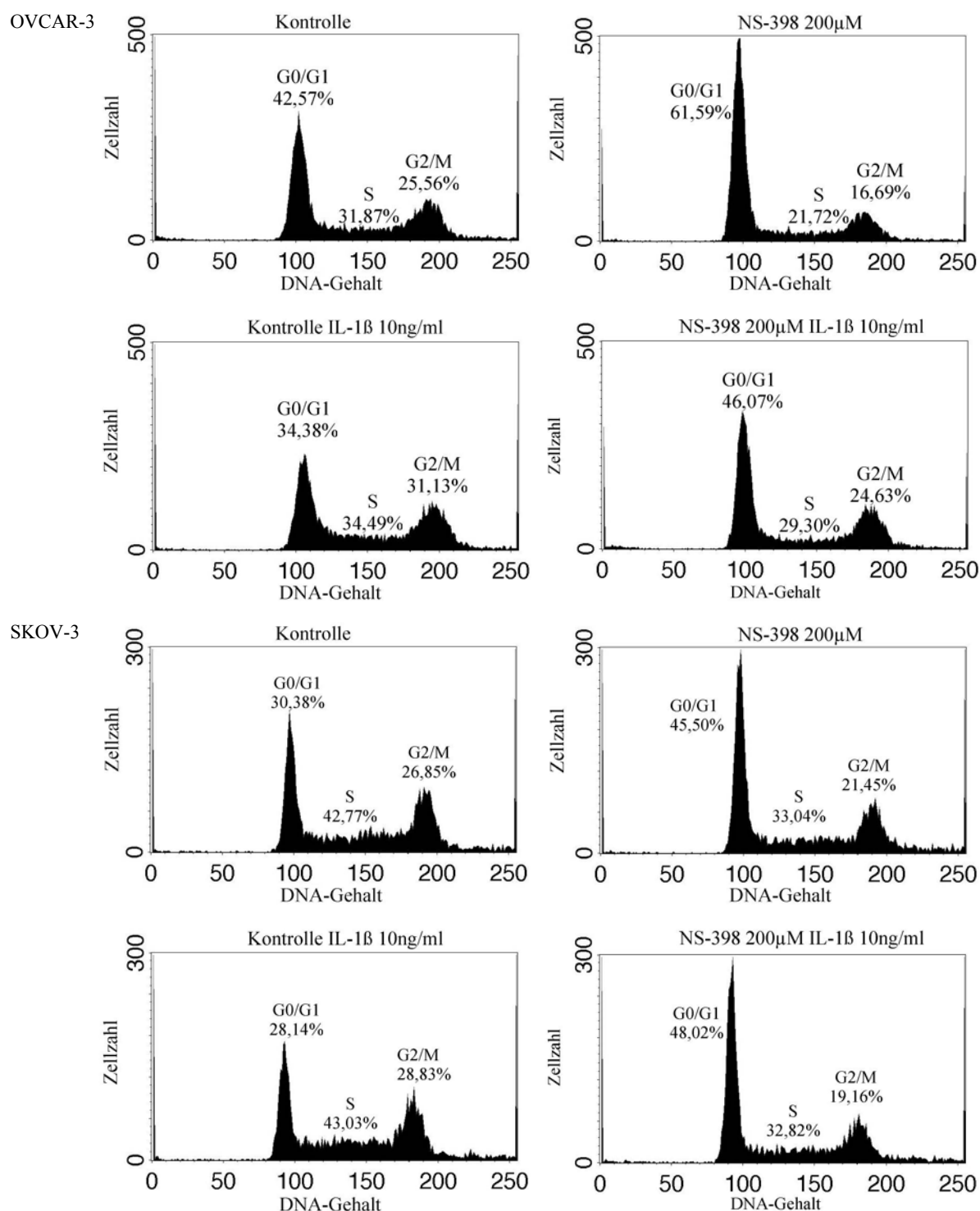


Abbildung 19: Effekt von NS-398 und IL-1β auf den Zellzyklus in zwei Zelllinien OVCAR-3 und SKOV-3. Die Zellen wurden 24h mit NS-398 (200μM) bzw. NS-398 und IL-1β (10ng/ml) inkubiert. Als Kontrolle diente das Lösungsmittel DMSO. Die Zellen wurden mit der Nicoletti-Methode aufbereitet und durchflußzytometrisch bestimmt. Ergebnis eines repräsentativen Experiments von mindestens drei unabhängigen Experimenten.

Tabelle 5: Effekt von NS-398 und IL-1 β auf den Zellzyklus in zwei Zelllinien OVCAR-3 und SKOV-3. Die Zellen wurden 24h mit NS-398 (200 μ M) bzw. NS-398 und IL-1 β (10ng/ml) inkubiert. Als Kontrolle diente das Lösungsmittel DMSO. Die Zellen wurden mit der Nicoletti-Methode aufbereitet und durchflußzytometrisch bestimmt. Ergebnisse (Mittelwert und Standardabweichung) von mindestens drei unabhängigen Experimenten. t-Test: zweiseitig, gepaart, * NS-398 vs. Kontrolle; ⁺NS-398/IL-1 β vs. Kontrolle/IL-1 β

	Zellzyklus- phase	Kontrolle	NS-398 200 μ M	Kontrolle IL-1 β	NS-398 200 μ M IL-1 β
OVCAR-3	G0/G1	40,2 \pm 2,5	53,0 \pm 6,7 *p=0,0002	30,6 \pm 2,4	41,9 \pm 5,0 ⁺ p=0,0175
	S	32,8 \pm 3,2	26,0 \pm 4,0 *p=0,0004	33,7 \pm 3,0	30,3 \pm 1,5 ⁺ p=0,0562
	G2/M	27,0 \pm 1,8	21,0 \pm 3,6 *p=0,0066	35,6 \pm 3,3	27,8 \pm 3,9 ⁺ p=0,0320
SKOV-3	G0/G1	34,5 \pm 3,7	43,5 \pm 5,2 *p=0,0004	31,7 \pm 3,9	46,4 \pm 1,5 ⁺ p=7,3*10 ⁻⁵
	S	36,3 \pm 3,0	31,3 \pm 1,9 *p=0,001	40,2 \pm 3,3	31,3 \pm 1,6 ⁺ p=5,2*10 ⁻⁵
	G2/M	29,2 \pm 3,0	25,2 \pm 5,6 *p=0,002	28,1 \pm 1,6	22,3 \pm 2,2 ⁺ p=0,002

4.3.2 Beeinflussung des Zellzyklus durch COX-1- und COX-2-siRNA

Bei der Transfektion mit COX-1-siRNA und COX-2-siRNA konnte in keinem Fall eine signifikante Zunahme der in der G0/G1-Phase befindlichen Zellen im Vergleich zur Transfektionskontrolle festgestellt werden (Abb.20;Tab.6). Auch in den anderen Phasen des Zellzyklus traten keine signifikanten Veränderungen gegenüber der Kontrolle auf.

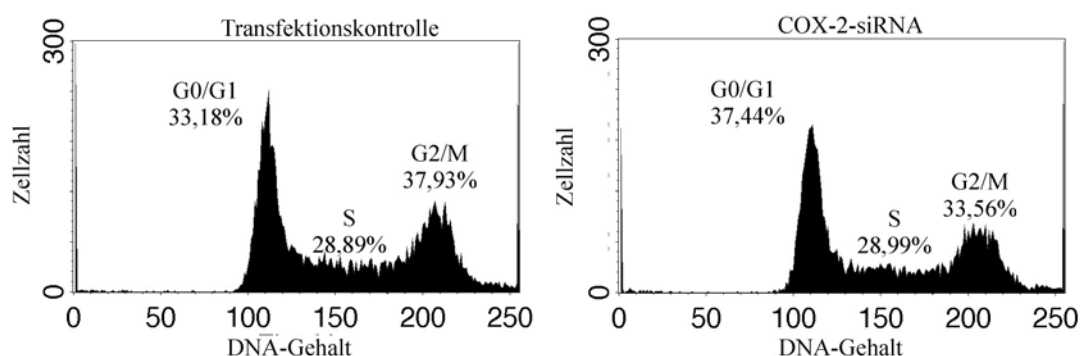


Abbildung 20: Effekt der Transfektion mit COX-2-siRNA (60pM) auf den Zellzyklus bei OVCAR-3. Die Zellen wurden nach 24h Inkubation mit siRNA geerntet, mit der Nicoletti-Methode aufbereitet und durchflußzytometrisch bestimmt. Ergebnis eines repräsentativen Experiments von mindestens drei unabhängigen Experimenten.

Tabelle 6: Effekt der siRNA-Transfektion auf den Zellzyklus bei OVCAR-3. Die Zellen wurden nach 24h Inkubation mit siRNA (je 60pM) mit und ohne IL-1 β -Stimulation (10ng/ml) geerntet, mit der Nicoletti-Methode aufbereitet und durchflußzytometrisch bestimmt. Ergebnisse (Mittelwert und Standardabweichung) von mindestens drei unabhängigen Experimenten

Zellzyklusphase	Transfektionskontrolle	COX-1-siRNA	COX-2-siRNA
G0/G1	36,3 \pm 3,5	37,9 \pm 1,0	36,5 \pm 2,0
S	35,5 \pm 2,8	35,3 \pm 1,0	34,4 \pm 1,4
G2/M	28,2 \pm 2,5	26,8 \pm 2,0	29,1 \pm 2,0

Zellzyklusphase	Transfektionskontrolle	COX-1-siRNA	COX-2-siRNA
	IL-1 β	IL-1 β	IL-1 β
G0/G1	24,5 \pm 0,8	29,5 \pm 2,2	28,3 \pm 1,9
S	36,7 \pm 2,9	33,7 \pm 1,6	35,1 \pm 2,4
G2/M	38,8 \pm 3,7	36,8 \pm 3,7	36,6 \pm 0,5

4.3.3 Einfluß von NS-398 auf die S-Phase des Zellzyklus

Aus den Ergebnissen der Zellzyklusanalyse von 4.3.1 konnte eine Zunahme der in der G0/G1-Phase befindlichen Zellen registriert werden. Daraufhin wurde mit der BrdU-Färbung (vgl. 3.8.2) untersucht, inwieweit die S-Phase durch die Akkumulation der Zellen in der G1-Phase vermindert wird.

In beiden Zelllinien konnte bei Gabe von NS-398 (200 μ M) eine Abnahme der S-Phase um ca. 10% gemessen werden (Abb.21): signifikant in den OVCAR-3 ($\hat{u}=1,72$), nicht signifikant bei SKOV-3. Bei dieser Untersuchungsmethode wurde in beiden Zelllinien eine etwas stärkere Reduzierung der S-Phase gemessen als dies anhand der Zellzyklusanalyse (4.3.1) deutlich war.

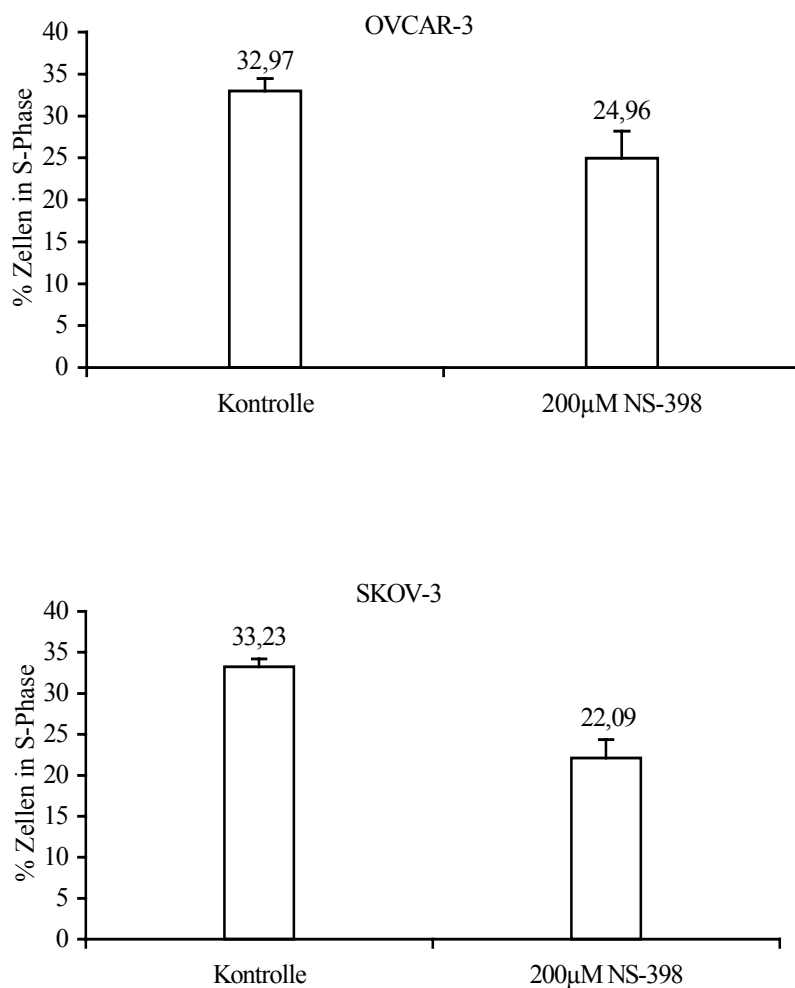


Abbildung 21: Effekt von NS-398 auf die S-Phase der Zelllinien OVCAR-3 und SKOV-3. Die Zellen wurden 24h mit NS-398 (200µM) inkubiert. Als Kontrolle diente das Lösungsmittel DMSO. Die Zellen wurden mit der BrdU-Methode aufbereitet und durchflußzytometrisch bestimmt. Die S-Phase wurde mit der Software CellQuest analysiert. Ergebnis (Mittelwert und Standardabweichung) von drei (OVCAR-3) bzw. zwei (SKOV-3) unabhängigen Experimenten.

5 Diskussion

5.1 Einfluß von NS-398 auf Proliferation und Apoptose von Ovarialkarzinomzelllinien

5.1.1 NS-398 führt in den untersuchten Zelllinien OVCAR-3 und SKOV-3 zu Proliferationshemmung durch Akkumulation der Zellen in der G0/G1-Phase

NS-398 führt sowohl in der COX-2-positiven Zelllinie OVCAR-3 als auch in der COX-2-negativen Zelllinie SKOV-3 zu einer dosisabhängigen Abnahme der Proliferation sowohl unter Bedingungen, bei denen die COX-2-Expression durch IL-1 β -Gabe hochreguliert ist als auch ohne diese Stimulation. Diese Ergebnisse sind mit den Ergebnissen von Rodriguez-Burford et al. über die Wirkung von NSAIDs auf Ovarialkarzinomzelllinien vergleichbar [91]. In Übereinstimmung mit anderen Arbeiten, in denen die Wirkungen von NSAIDs auf Tumorzellen untersucht wurden (vgl. 5.2.: Tab. 7), konnten auch in diesen Versuchen Effekte erst mit relativ hohen Konzentrationen erreicht werden. Die IC₅₀ von NS-398 wird für die COX-2 mit 0,35 μ M angegeben; 80% des COX-2-Enzyms sind bei 1 μ M inhibiert. Bei einer Konzentration von 6,9 μ M NS-398 wird bereits die IC₅₀ der COX-1 erreicht. Die IC₈₀ der COX-1 wird mit 65 μ M angegeben [15]. Signifikante Proliferationshemmungen konnten in der vorliegenden Arbeit erst ab 10 μ M (mit IL-1 β) bzw. 50 μ M (ohne IL-1 β) bei OVCAR-3 erzielt werden. Diese hohen Konzentrationen lassen an einer Rolle des COX-2-Proteins bei der Proliferationsinhibition zweifeln.

Zusätzlich wurde im PGE₂-ELISA gezeigt, daß der Inhibitor NS-398 bereits bei 1 μ M die COX-2 bzw. deren PGE₂-Produktion vollständig hemmt. Die PGE₂-Produktion dient als verlässlicher Parameter für die COX-2-Aktivität in den OVCAR-3-Zellen, denn mittels der siRNA-Transfektion wurde nachgewiesen, daß nur die COX-2-siRNA die PGE₂-Produktion vermindern konnte, während die COX-1-siRNA keinen Einfluß darauf hatte. Somit kommt nur die COX-2 als Quelle der PGE₂-Produktion in den OVCAR-3-Zellen in Betracht.

Die PGE₂-Produktion war zwar durch die COX-2-siRNA nicht so stark reduziert worden wie durch NS-398, aber signifikant im Vergleich zu Lamin A/C-siRNA und COX-1-siRNA. Eine Ursache dafür kann in der nicht hundertprozentigen Transfektionseffizienz liegen. Außerdem hat die Ausschaltung der mRNA einen naturgemäßen Zeitaufschub gegenüber der direkten medikamentösen Proteinhemmung. Zum Zeitpunkt der Transfektion ist ja bereits eine gewisse Menge Protein in der Zelle vorhanden, das weiterhin PGE₂ bilden kann.

Mehrere Arbeiten zeigen, daß durch Zugabe von PGE₂ der proliferationshemmende oder apoptotische Effekt von NSAIDs zumindest teilweise reversibel ist [33, 60].

Der in diesem Zusammenhang von einigen Autoren geäußerten Vermutung, daß der Entzug von Prostaglandin E maßgeblich für die NSAID-induzierte Wachstumshemmung verantwortlich ist, muß im hier untersuchten Modellsystem der Ovarialkarzinomzelllinien OVCAR-3 und SKOV-3 in mehreren Punkten widersprochen werden:

1. Die Diskrepanz zwischen der zur PGE₂-Reduktion notwendigen Konzentration von NS-398 (1 µM) und der zur Wachstumshemmung erforderlichen (mindestens 10 µM) spricht dagegen.
2. Die durch NS-398 induzierte Proliferationshemmung konnte nicht durch exogene PGE₂-Gabe aufgehoben werden.

Damit wird nicht der Aussage widersprochen, daß PGE₂ am Zellwachstum essentiell beteiligt ist. In beiden Zelllinien ließ sich unter PGE₂ ein vermehrtes Wachstums im XTT-Test nachweisen. Für SKOV-3 und eine andere Ovarialkarzinomzelllinie war dieser PGE₂-Effekt zuvor gezeigt worden [99].

Mit den bisherigen Ergebnissen kann andererseits keine Aussage darüber getroffen werden, ob möglicherweise andere Prostaglandine am Zellüberleben essentiell beteiligt sind, deren Konzentrationen durch COX-Inhibition stark vermindert werden könnten. Bereits einleitend erwähnt wurde die Rolle von Prostacyclin und dessen positiv stimulierende Funktion als Ligand an dem für die Zellproliferation wichtigen Transkriptionsfaktor PPAR δ . Möglich wäre, daß es durch das Fehlen von bestimmten Prostaglandinen bzw. durch die veränderte Zusammensetzung des Prostaglandinspektrums in der Zelle zu PPAR-vermittelter Wachstumshemmung kommt.

Es gibt weiterhin die Vermutung, daß die NSAID-induzierte Proliferationshemmung durch die gleichzeitige Inhibition beider COX-Isoformen zustande kommt. Dagegen spricht die Tatsache, daß in den vorliegenden Untersuchungen die COX-negative Zelllinie SKOV-3 ähnlich auf NS-398 reagiert wie die COX-positiven OVCAR-3-Zellen.

Auch Indomethacin, ein unselektiver COX-Inhibitor, konnte die Proliferation der Zellen erst weit oberhalb der IC₈₀ beider Isoformen inhibieren (OVCAR-3 bei 50 µM; SKOV-3 bei 500 µM). Die IC₅₀ von Indomethacin wird für die COX-2 mit 1,0 µM angegeben. 80% des COX-2-Enzyms sind bei 5 µM inhibiert. Bei 0,013 µM Indomethacin liegt bereits die IC₅₀ der COX-1. Die IC₈₀ der COX-1 beträgt 0,46 µM [15].

Diese Ergebnisse deuten darauf hin, daß es sich bei der Proliferationshemmung um einen COX-1- und COX-2- und somit auch Prostaglandin-unabhängigen Mechanismus handelt und weisen auf ein non-COX-Target hin.

In beiden Zelllinien akkumulieren die Zellen in der G0/G1-Phase des Zellzyklus. Dieser G0/G1-Arrest bietet eine plausible Erklärung für die aufgetretene Proliferationshemmung unter NS-398-Gabe. Damit geht eine deutliche Abnahme der S-Phase einher. Diese Ergebnisse sind mit den bereits von einigen Arbeitsgruppen gefunden Hinweisen für einen G1-Arrest durch NS-398 vereinbar (vgl. 5.2:Tab.7). Die eingesetzten Konzentrationen sind auch hier wesentlich höher als die zur COX-1- und COX-2-Proteinhemmung notwendigen.

5.1.2 Die Transfektion von OVCAR-3 mit COX-1- bzw. COX-2-siRNA bewirkt keine Proliferationshemmung

Weder die Ausschaltung der COX-1 noch der COX-2 durch siRNA führte zu Veränderungen der Proliferationsrate oder der Zellzyklusdistribution. Mit diesen Untersuchungen können die Ergebnisse von Toyoshima et al. nicht bestätigt werden, die fanden, daß durch COX-2-Antisense-Ausschaltung in Plattenepithelkarzinomzelllinien ein G1-Arrest induziert wurde [100]. Diese unterschiedlichen Ergebnisse beruhen möglicherweise auf den verschiedenen Zellsystemen und den angewandten Methoden der Genausschaltung.

5.1.3 NS-398 bewirkt keine Apoptose in den Zelllinien OVCAR-3 und SKOV-3

NS-398 führte in Konzentrationen bis zu 200µM in keiner der beiden hier untersuchten Zelllinien zu Apoptose oder Nekrose (vgl. 4.1.1). Die maximale Konzentration lag bereits über den von anderen Arbeitsgruppen zur Induktion von Apoptose eingesetzten Dosen, die in anderen Modellsystemen durch NSAIDs Apoptoseinduktion in Tumorzellen zeigen konnten (vgl. 1.1.7:Tab.4).

Außerdem gibt es parallel zu dieser Arbeit mehrere Untersuchungen, in denen bei NS-398-Konzentrationen bis zu 100µM keine Apoptose beobachtet werden konnte, dagegen jedoch eine deutliche Proliferationshemmung als Ursache für die Abnahme der Zellzahl gefunden wurde [101,102].

Weiterhin konnte in den vorliegenden Experimenten auch keine nekrotische Zellschädigung durch NS-398-Gabe nachgewiesen werden. Dies ist von Bedeutung, da die Autoren Subbegowda und Frommel in ihrer Arbeit gezeigt hatten, daß es sich bei dem Zelltod von Kolonkarzinomzellen durch Aspirin um Nekrose und nicht Apoptose handelte [103].

Im Gegensatz zur alleinigen NS-398-Applikation ohne nekrotische Effekte, ließ sich jedoch durch IL-1 β zytotoxische Nekrose bei den OVCAR-3 induzieren. In der Kombination von IL-1 β mit 200 μ M NS-398 erhöhte sich diese Zytotoxizität in beiden Zelllinien um ca. 30 %.

Es ist bereits seit längerem bekannt, daß IL-1 β eine wichtige Rolle bei der Ovulation spielt. Dieser Prozeß erfordert sowohl Gewebsreifung als auch Zelltod. Zytotoxische Effekte durch Applikation von IL-1 β auf Ovarialdeckepithelzellen von Ratten [104], aber auch Apoptoseinduktion durch kombinierte Gabe von IL-1 β mit Interferon- γ (IFN- γ) und Tumornekrosefaktor- α wurden zuvor beschrieben. Die vermehrte Apoptose konnte mit der Induktion der iNO-Synthase begründet werden [105].

Der Einsatz von Zytokinen in der Therapie von Ovarialkarzinomen wurde für Interleukin-1 α [106] und IFN- γ [107] bereits in klinischen Studien untersucht mit Hinweisen auf eine verbesserte Wirkung der Chemotherapie gegen das Tumorwachstum. Für IL-1 β ist bisher nichts über klinische Anwendungen in der Behandlung von Krebserkrankungen bekannt. Dazu bleiben weitere experimentelle Studien abzuwarten. Die hier beobachtete vermehrte Zellnekrose durch zusätzliche Gabe von NS-398 kann vielleicht mit der durch COX-2-Inhibitoren bewirkten Sensibilisierung für apoptotische Stimuli erklärt werden, auf die später noch eingegangen wird.

5.1.4 Die Transfektion von OVCAR-3 mit COX-1- bzw. COX-2-siRNA bewirkt keine Apoptose

Die Transfektion der OVCAR-3-Zellen mit COX-1 bzw. COX-2-siRNA führte nicht zu vermehrter Apoptose gegenüber der Transfektionskontrolle.

Aus diesen und den oben genannten Ergebnissen läßt sich ableiten, daß die Inhibition der COX-2 mit großer Wahrscheinlichkeit für die Apoptoseinduktion in den OVCAR-3-Zellen keine Rolle spielt. Ähnliche Ergebnisse enthält die Arbeit von Song et al. [108], wo durch Ausschaltung der COX-2 in Prostatakarzinomzellen mit der Antisense-Methode ebenfalls keine Apoptose beobachtet werden konnte, während Celecoxib in diesen Zellen Apoptose induzierte. Die Autoren zeigten zusätzlich, daß man durch chemische Modifikationen von Celecoxib die COX-inhibitorische Aktivität von der apoptoseinduzierenden Aktivität des Medikaments dissoziieren kann. Medikamente ohne COX-inhibitorische Aktivität konnten in gleichem Maße Apoptose induzieren wie Celecoxib. Die Apoptose durch Celecoxib war innerhalb von wenigen Stunden aufgetreten. Dagegen konnten ähnlich potente COX-2-Inhibitoren wie z.B. NS-398, Rofecoxib oder DuP697 erst sehr verzögert (nach 96-120h) apoptotische Effekte induzieren. Die

Autoren vermuteten, daß Celecoxib über andere Mechanismen Apoptose bewirkt als die erwähnten COX-2-selektiven Medikamente.

Mit den Ergebnissen der vorliegenden Untersuchungen und der zuvor genannten Arbeiten erscheint es wichtig, die NSAIDs hinsichtlich ihrer Strukturunterschiede und der vermittelnden apoptoseregulierenden Pathways genauer zu charakterisieren. Es häufen sich die Hinweise dafür, daß es kein allgemeingültiges Schema gibt, mit dem die Wirkung von NSAIDs auf Tumorzellen erklärt werden kann, sondern daß vielmehr Wirkungsweise und Zielstruktur von unterschiedlichen NSAIDs auf verschiedene Zellen stark divergieren.

5.1.5 Die durch NS-398 induzierte Proliferationshemmung ist vermutlich COX-1- und COX-2-unabhängig

Mehrere Ergebnisse dieser Arbeit sprechen dafür, daß es sich bei dem durch NS-398 induzierten G1-Arrest um einen COX-2-unabhängigen Effekt handelt:

1. Die Konzentration von NS-398, die zur Inhibition der Proliferation notwendig war, lag wesentlich höher als die zur Inhibition der PGE-2-Produktion und damit zur Hemmung der COX-2 eingesetzte.
2. Der antiproliferative Effekt von NS-398 trat ebenfalls in einer COX-2-negativen Zelllinie (SKOV-3) auf.
3. Exogene Gabe von PGE2 konnte die durch NS-398 hergestellte Proliferationshemmung nicht aufheben.
4. Auch das unselektive NSAID Indomethacin konnte in beiden Zelllinien eine Verringerung des Zellwachstums bewirken. Dieser Effekt trat wie auch bei NS-398 erst bei wesentlich höheren Konzentrationen auf als sie zur Hemmung von sowohl COX-1 als auch COX-2 notwendig sind.
5. Weder COX-1- noch COX-2-siRNAs zeigten der Proliferationshemmung von NS-398 vergleichbare Effekte, obwohl die COX-2-siRNA durch Ausschaltung der COX-2 ebenfalls zur Inhibition der PGE2-Synthese führte.

5.2 Mögliche Zellzyklus-Targets der NSAIDs

Im folgenden sollen Ansatzpunkte für weitere Studien diskutiert werden, die zur Aufklärung eines COX-unabhängigen Wirkmechanismus von NS-398 beitragen könnten. Es gibt bereits verschiedene Hinweise für eine Beeinflussung von Zellzyklus-regulierenden Proteinen durch NSAIDs:

Der Zellzyklus wird von Cyclinen und den assoziierten Cyclin-abhängigen Kinasen (Cyclin dependent Kinases, CDKs) reguliert. Spezifische Cyclin/CDK-Komplexe regulieren die Checkpoints des Zellzyklus – die Phasenübergänge. Einer der wichtigsten Checkpoints liegt in der späten G1-Phase, kurz vor dem Start der DNA-Replikation. Dieser wird durch D-Typ-Cycline reguliert, die mit CDK2 und CDK4 assoziiert sind. Mehrere CDK Inhibitoren (CKIs) wurden identifiziert. CKIs inhibieren die Cyclin/CDK-Komplexe und somit den Fortgang des Zellzyklus. Zwei strukturelle Klassen von CKIs sind beschrieben worden: die p21-Familie, dazu gehören $p21^{CIP1}$, $p27^{KIP1}$ und $p57^{KIP2}$, welche speziell die G1- und die S-Phase inhibieren, und die INK-Familie, zu der die $p16^{INK4A}$, $p15^{INK4B}$, $p18^{INK4C}$ und $p19^{INK4D}$ gehören, die nur die G1-spezifische D-CDK4/6 inhibieren [109].

Tabelle 7 stellt zusammen, welche Angriffspunkte in der Regulation des Zellzyklus für COX-2-Inhibitoren bereits gefunden wurden.

Für fast jedes der in Tabelle 7 erwähnten Targets gibt es ebenfalls Arbeiten zu den Wirkungen von nichtselektiven COX-Inhibitoren (Aspirin, Ibuprofen, Sulindac, Indomethacin u.a.) [zusammengefaßt in 70]. Zum großen Teil sind die Effekte in bezug auf Expressionsminderung oder -steigerung eines Proteins zwischen COX-2-selektiven und -nichtselektiven NSAIDs übereinstimmend. Mehrere NSAIDs konnten die Expression von Cyclinen und CDKs mindern, während die Expression von p21, p27 und p53 verstärkt wurde. Das relativ homogene Verhalten könnte doch zumindest auf eine gemeinsame Endstrecke der NSAIDs für die Induktion des G1-Arrestes hinweisen.

Tabelle 7: Proliferationshemmung durch selektive COX-2-Inhibitoren und Expressionssteigerung (↑) oder Expressionsminderung (↓) von Zellzyklusproteinen als mögliche Targets der NSAIDs

NSAID	Konzentration des NSAIDs für den Wachstumsseffekt	Zelllinie	Proliferations-effekt	Target
NS-398	79,5µM	squamöses Karzinom der Zunge [100]	G0/G1-Arrest	p21↑
NS-398	100µM	Bronchialkarzinom [101]	G0/G1-Arrest	p27 ^{KIP1} ↑ Cyclin E DK↓
NS-398	75µM	Kolonkarzinom [110]	G0/G1-Arrest	-
NS-398	100µM	Osteosarkom [111]	G0/G1-Arrest	p21↑ p53↑
NS-398	100µM	Pankreaskarzinom [102]	G0/G1-Arrest	Cyclin D1↓ Cyclin E↓ Cyclin B1↓ Cyclin A↓ p27 ^{KIP1} ↑
NS-398	100µM	Magenkarzinom [112]	Proliferations-hemmung	MAPK↓
SC-58125	-	humanes Kolonkarzinom-Xenograft in Mäusen [65]	verzögerter G2/M-Übergang	p34(cdc2)↓

Insgesamt stellen diese Untersuchungsergebnisse, die gut zu den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit passen, ebenso die spezifische Funktion der COX-2 als einziges für die Proliferationshemmung verantwortliches NSAID-Target infrage. Im Gefolge dieser Arbeit soll in weiteren Projekten die Zellzyklusregulation in Ovarialkarzinomzelllinien näher untersucht werden.

Im folgenden sollen nun einige Arbeiten vorgestellt werden, die Grundlage weitergehender Studien sein könnten:

Interessanterweise gibt es zwei Arbeiten, die durch Überexpression der COX-2 eine Proliferationshemmung auslösen konnten. Diese Beobachtung trat in verschiedenen Zelltypen auf, darunter Gefäßendothelzellen, embryonale Nierenzellen [113] und Mesangialzellen [114].

Tumorzellen wurden bisher nicht untersucht. In der Arbeit von Zahner et al. [114] wurde gleichzeitig mit der Proliferationshemmung die Induktion mehrerer Gene festgestellt, darunter p53, p21 und p27, die für die Zellzykluskontrolle insbesondere die G1-Arretierung, eine wichtige Funktion einnehmen. Diese Genregulation paßt sehr gut zu der Arbeit von Trifan et al. [113], in der durchflußzytometrisch ein G1-Arrest als Ursache der Wachstumsinhibition durch COX-2-Überexpression nachgewiesen wurde.

Vermittelt wird diese Wachstumshemmung möglicherweise durch das COX-Produkt PGJ₂, von dem ebenfalls bekannt ist, daß es in den glatten Muskelzellen von Blutgefäßen einen G1-Arrest induzieren konnte [115]. PGJ₂ kann zusätzlich als Agonist an PPAR γ die Expression der COX-2 in Makrophagen unterdrücken, so daß hier ein negativer Feedbackmechanismus vorliegen könnte, mit dem die Expression der COX-2 in der Zelle reguliert wird [116]. Störungen der COX-2-Regulation könnten u.a. die Ursache für die erhöhte COX-2-Expression in bestimmten Tumoren sein.

Auf der anderen Seite wird durch hohe Konzentrationen von NS-398 die mRNA der COX-2 kompensatorisch hochreguliert [58,117]. Dasselbe wurde auch nach Gabe von Indomethacin und dem selektiven COX-1-Inhibitor SC-560 gezeigt, während bei Rofecoxib-Behandlung nach 6h keine vermehrte COX-2-mRNA-Expression meßbar war [118]. Eine Erklärung dafür könnte die Interaktion der NSAIDs mit NF κ B (vgl. 1.2.1) bieten, denn NF κ B kann als Promotor die Transkription der COX-2 induzieren. Ob diese kompensatorische Hochregulation der COX-2 in Zusammenhang mit dem G1-Arrest steht oder nur ein „Nebenprodukt“ im Rahmen einer komplexen Genanschaltung für die Wachstumshemmung darstellt, ist bisher nicht untersucht.

Bei der Suche nach weiteren Targets sollte auch noch die mögliche Funktion des mTOR-Pathways und der p70^{s6k}, einer Mitogen-aktivierten Proteinkinase, Erwähnung finden. Diese komplex regulierte Kinase p70^{s6k} spielt ebenfalls eine wichtige Rolle für den G1-Zellzyklusfortgang. Law et al. zeigten, daß die Inhibition dieses p70^{s6k}-Proteins mit Salizylat-induziertem Wachstumsarrest assoziiert und gleichzeitig für die aufgetretene Downregulation von c-Myc, Cyclin D1, Cyclin A und Proliferating Cell Nuclear Antigen verantwortlich ist [119]. Allgemeingültig scheint jedoch auch dieser Weg nicht zu sein, da Acetaminophen und Indomethacin keinen Effekt auf die p70^{s6k}-Aktivität zeigten.

Des weiteren wurde die Theorie aufgestellt, daß die Hemmung der intrazellulären Freisetzung von Kalzium an dem G1-Arrest verschiedener NSAIDs ursächlich beteiligt sein könnte [120]. Kalzium fungiert in Kolonkarzinomzelllinien als wichtiger Wachstumsstimulus. Sulindac Sulfid

und Mefenamic Acid konnten die Freisetzung von Kalzium blockieren und einen G1-Arrest induzieren. Acetylsalizylsäure bewirkte dagegen keinen G1-Arrest und führte auch nicht zur Kalziumfreisetzung.

Diese oben genannten Einzelbeobachtungen bieten interessante Punkte für eine weitere Erforschung der genauen intrazellulären Transduktionswege für den Zusammenhang von NS-398 und Zellzyklusarrest.

5.3 Apoptosepriming durch NSAIDs – klinische Perspektiven

Zum klinischen Einsatz von COX-2-Inhibitoren bei Ovarialkarzinomen sowohl chemopräventiv als auch in der adjuvanten Chemotherapie gibt es bisher keine Daten. Das Problem der Anwendung von Proliferationshemmern in der Kombination mit einem Zytostatikum besteht in ihrer möglicherweise antagonistischen Wirkung durch die reduzierte Zahl an Zellen, die sich in der S-Phase befinden, wodurch weniger Zellen durch das Zytostatikum angegriffen werden können. Andererseits gibt es bereits Arbeiten, die zeigen, daß die Zytotoxizität von Chemotherapeutika auf Tumorzellen *in vitro* durch COX-2-Inhibitoren eher verstärkt werden kann [61,121].

Möglicherweise kann NS-398 in OVCAR-3 sogenanntes Apoptosepriming hervorrufen, d.h. die Zellen für apoptotische Stimuli sensibilisieren. Die Proliferationshemmung gilt als wichtiger initialer Schritt auf dem Weg zur Apoptose.

In der Arbeit von Hida et al. wurde gezeigt, daß die Kombination mit Nimesulid, einem COX-2-Inhibitor, die Wirksamkeit mehrerer Chemotherapeutika verstärken kann [61].

Celecoxib steigert bei gleichzeitiger Anwendung mit Lovostatin die Apoptoserate bei Kolonkarzinomzellen im Vergleich zur Einzelanwendung um ein Vielfaches [121].

In einer weiteren Studie wurde eine Verstärkung der Radiosensitivität von Zellen beobachtet, die zuvor mit NS-398 (150-400µM) behandelt worden waren [122].

Auch die Proliferationshemmung wird durch kombinierte Anwendung verstärkt: Gemcitabine konnte in Pankreaskarzinomzellen bei gleichzeitiger Gabe von Sulindac oder NS-398 eine größere Proliferationshemmung erreichen als in der Einzelanwendung [102].

Diese Ergebnisse könnten auf ähnlichen Mechanismen basieren wie die in dieser Arbeit erzielten Apoptose-/Nekrosesteigerungen bei gleichzeitiger Anwendung von NS-398 mit IL-1ß. Im Gefolge dieser Arbeit wurden erste Versuche einer kombinierten Gabe von Cisplatin mit

NS-398 bei OVCAR-3 unternommen, die Hinweise für eine Verstärkung der Cisplatin-induzierten Apoptose lieferten.

Ein möglicher Mechanismus für die NSAID-vermittelte Apoptose-Sensibilisierung von Tumorzellen wäre z.B. denkbar über das Prostate apoptosis response gen (Par-4-Gen). Par-4 ist bekannt als Gen, das allein nicht zur Apoptoseinduktion ausreichend ist, aber Zellen für apoptotische Stimuli sensibilisieren kann. Von mehreren NSAIDs wurde gezeigt, daß sie in Kolonkarzinomzellen das Par-4-Gen hochregulieren [123]. Par-4-Überexpression in Phäochromozytomzellen resultierte in einer Blockade der DNA-Bindung von NFκB und in fehlender NFκB-Aktivierung nach Entzug von Nährstoffen, was mit vermehrter Apoptose einherging. Zusätzlich war die Expression des antiapoptotischen Bcl-2 deutlich reduziert [124], was damit erklärt wurde, daß Bcl-2 u.a. zu den Genen gehört, die durch NFκB reguliert werden [125]. Hier könnte ein Zusammenhang zu den Beobachtungen bestehen, wo durch NS-398 die Bcl-2-Expression in Tumoren vermindert wurde (vgl.1.1.6).

Der bereits einleitend erwähnten Einflußnahme der NSAIDs auf die Funktion von NFκB, welches eine zentrale Rolle sowohl im Zellzyklus als auch für die Apoptose von Tumoren hat, sollte daher weiter nachgegangen werden.

Auch unter dem Aspekt der Apoptose-Sensibilisierung wird es wichtig sein, die Zielstruktur eines in der Chemotherapie adjuvant eingesetzten NSAIDs zu kennen, um den zu behandelnden Tumor auf die Expression der entsprechenden Gene zu testen und dann durch gezielte NSAID-Applikation den Erfolg einer Chemotherapie zu verbessern.

6 Zusammenfassung und Ausblick

Die Cyclooxygenase-2 (COX-2) ist ein Schlüsselenzym des Arachidonsäurestoffwechsels. Cyclooxygenasen vermitteln durch die Produktion verschiedener Prostaglandine ein breites Spektrum physiologischer Wirkungen, von der Thrombozytenaggregation bis zur Vasokonstriktion. Der COX-2 wird zudem eine bedeutende Rolle sowohl für die Entstehung als auch für die Progression maligner Tumoren zugesprochen. Die Expression der COX-2 konnte in verschiedenen Tumoren nachgewiesen werden. Bei COX-2-positiven Tumoren wurden zum Teil höhere Malignität und eine schlechtere Prognose der Erkrankung festgestellt.

Cyclooxygenase-Inhibitoren haben zusätzlich zu ihrem weiten Anwendungsspektrum als anti-entzündliche Medikamente neue Bedeutung durch chemopräventive Effekte bei der Behandlung von Tumorerkrankungen des Darmtrakts erlangt. Im Zellkulturmodell führten COX-Inhibitoren zu Proliferationshemmung und Induktion von Apoptose bei Tumorzellen.

Die Erkenntnisse zum Zusammenhang zwischen der Cyclooxygenase-2-Inhibition und der Beeinflussung von Tumorentstehung und -wachstum divergieren jedoch zum Teil sehr stark je nach untersuchtem experimentellen Modellsystem und eingesetzten Inhibitor. Verschiedene Untersuchungen deuten darauf hin, daß die COX-Inhibitoren auch unabhängig von der COX-2 - über sogenannte non-COX-Targets - ihre anti-Tumor-Effekte vermitteln können.

In der vorliegenden Arbeit wurde am Modell einer COX-2-positiven (OVCAR-3) und einer COX-2-negativen (SKOV-3) Ovarialkarzinomzelllinie untersucht, ob durch die COX-2-Inhibition Proliferation und Apoptose in diesen Zellen beeinflusst werden. Des weiteren wurde der Frage nachgegangen, ob diese Effekte in Zusammenhang mit der COX-2-Inhibition stehen oder über ein non-COX-Target vermittelt werden.

Zur Differenzierung von COX-2-spezifischer und -unspezifischer Wirkung wurden zwei Methoden der COX-2-Inhibition miteinander verglichen:

1. die pharmakologische Inhibition durch den selektiven COX-2-Inhibitor NS-398 und
2. die Ausschaltung der COX-2 durch die COX-Isoform-spezifische RNA-Interferenz (RNAi).

Folgende Ergebnisse wurden in dieser Arbeit gefunden:

1. Unter Einfluß von IL-1 β wurde bei OVCAR-3 eine vermehrte Produktion von Prostaglandin E₂ (PGE₂) gemessen. Diese IL-1 β -induzierte PGE-2-Produktion konnte durch eine spezifisch

gegen die COX-2 gerichtete siRNA gehemmt werden, während eine COX-1-siRNA keinen Effekt hatte. Das deutet darauf hin, daß die COX-2 die Hauptquelle des gebildeten PGE₂ ist.

2. Der COX-2-Inhibitor NS-398 inhibierte die Produktion von PGE₂ und somit auch die COX-2 in den OVCAR-3-Zellen bereits in einer Konzentration von 1µM.

3. Im Gegensatz dazu führte NS-398 sowohl in der COX-2 positiven Zelllinie OVCAR-3 als auch in der COX-2 negativen Zelllinie SKOV-3 erst ab einer Inhibitor-Konzentration von 10µM zu einer verringerten Zellproliferation, die nicht durch Gabe von PGE₂ antagonisiert werden konnte. Die Inhibition der COX-2 durch siRNA hatte dagegen keine vergleichbaren Auswirkungen auf das Zellwachstum. Auch ein nichtselektiver COX-Inhibitor (Indomethacin) bewirkte in beiden Zelllinien eine Proliferationshemmung, aber ebenfalls erst in Konzentrationen, die weit oberhalb der berichteten IC₅₀ für COX-1 und COX-2 liegen. Diese Untersuchungen sprechen dafür, daß der anti-proliferative Effekt von NS-398 nicht als Folge der Inhibition der COX-2 sondern durch Wirkung auf ein anderes Zielprotein vermittelt wird.

4. Weder bei der COX-2-Inhibition durch NS-398 noch durch RNA Interferenz fand sich eine gesteigerte Apoptose oder Nekrose.

5. Der durch NS-398 induzierten Proliferationshemmung liegt in beiden Zelllinien ein G₀/G₁-Zellzyklusarrest zugrunde. Dagegen konnten bei der COX-Inhibition durch RNAi in OVCAR-3 keine Veränderungen des Zellzyklus gemessen werden. Diese Ergebnisse deuten auf einen COX-2-unabhängigen Mechanismus hin, der für den durch NS-398 induzierten G₀/G₁-Arrest verantwortlich ist.

Verschiedene Studien sprechen dafür, daß NSAIDs in der adjuvanten Chemotherapie Anwendung finden könnten. In dieser Studie wurde gezeigt, daß das NSAID NS-398 durch die Induktion eines G₀/G₁-Zellzyklusarrestes eine deutliche Hemmung der Proliferation von zwei Tumorzelllinien bewirken kann. Es gibt bereits mehrere Hinweise für einen Einfluß von NSAIDs auf Zellzyklus-regulierende Proteine. Durch genauere Charakterisierung der intrazellulären Angriffspunkte der NSAIDs, die Gegenstand von weiteren Untersuchungen sein könnte, kann die Spezifität dieser Medikamente in der Tumorthherapie erhöht werden. Zudem besteht die Möglichkeit, einen Tumor vor der Therapie auf die Expression bestimmter Targets zu testen, so daß für jeden Tumor eine adäquate pharmakologische Behandlung ausgewählt werden kann.

7 Literaturverzeichnis

-
- 1** Thun MJ et al. Aspirine use and reduced risk of fatal colon cancer. *N Engl J Med* 1991;325:1593-1596
 - 2** Giovannucci E et al. Aspirine use and the risk for colorectal cancer and adenoma in male health professionals. *Ann Intern Med* 1994;121:241-246
 - 3** Giardello FM et al. Treatment of colonic and rectal adenomas with sulindac in familial adenomatous polyposis. *N Engl J Med* 1993;328(18):1313-1316
 - 4** Labayle D et al. Sulindac causes regression of rectal polyps in familial adenomatous polyposis. *Gastroenterology* 1991;101(3):635-639
 - 5** Celecoxib in oncology research. Clinical trials. Pharmacia Oncology Publication. October 2002.
 - 6** Smith WL et al. Prostaglandin endoperoxide synthase: structure and catalysis. *Biochim Biophys Acta* 1991;1083:1-17
 - 7** Dempke W. et al. Cyclooxygenase-2: a novel target for cancer chemotherapy ? *J Cancer Res Clin Oncol* 2001;127:411-417
 - 8** Denkert et al. Expression of cyclooxygenase 2 is an independent prognostic factor in human ovarian carcinoma. *Am J Pathol* 2002;160(3):893-903
 - 9** Smith WL et al. Prostaglandin and Thromboxan biosynthesis. *Pharm Ther* 1991;49:153-179
 - 10** Tjandrawinata RR et al. Induction of cyclo-oxygenase-2 mRNA by prostaglandin E2 in human prostatic carcinoma cells. *Br J Cancer* 1997;75(8):1111-1118
 - 11** Qiao L et al. Selected eicosanoids increase the proliferation rate of human colon carcinoma cell lines and mouse colonocytes in vivo. *Biochim Biophys Acta* 1995;1258:215-223
 - 12** FitzGerald GA et al. The coxibs, selective inhibitors of cyclooxygenase-2. *N Engl J Med* 2001;345(6):433-442
 - 13** Jones DA et al. Molecular Cloning of Human Prostaglandin Endoperoxide Synthase Type II and Demonstration of Expression in Response to Cytokines. *J Biol Chem* 1993;268(12):9049-9054
 - 14** Chandrasekharan NV et al. COX-3, a cyclooxygenase-1 variant inhibited by acetaminophen and other analgesic/antipyretic drugs: cloning, structure, and expression. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2002 Oct 15;99(21):13926-31. Epub 2002 Sep 19.

-
- 15** Warner TD et al. Nonsteroidal drug selectivities for cyclo-oxygenase-1 rather than cyclo-oxygenase-2 are associated with human gastrointestinal toxicity: A full in vitro analysis. *Proc Natl Acad Sci USA* June 1999;96:7563-7568
- 16** Phillips RK et al. A randomised, double blind, placebo controlled study of celecoxib, a selective cyclooxygenase 2 inhibitor, on duodenal polyposis in familial adenomatous polyposis. *Gut* 2002 Jun;50(6):857-860
- 17** Sano H et al. Expression of Cyclooxygenase-1 and -2 in human colorectal cancer. *Cancer Res* 1995;55:3785-3789
- 18** Hida T et al. Increased expression of cyclooxygenase 2 occurs frequently in human lung cancers, specifically in adenocarcinomas. *Cancer Res* 1998;58(17):3761-3764
- 19** Achiwa H et al. Prognostic Significance of elevated Cyclooxygenase 2 expression in primary resected lung adenocarcinomas. *Clin Cancer Res* 1999;5(5):1001-1005
- 20** Gupta S et al. Over-expression of cyclooxygenase-2 in human prostate adenocarcinoma. *Prostate* 2000;42(1):73-78
- 21** Yip-Schneider et al. Cyclooxygenase-2 expression in human pancreatic adenocarcinomas. *Carcinogenesis* 2000;21(2):139-146
- 22** Lim HY et al. Increased expression of cyclooxygenase-2 protein in human gastric carcinoma. *Clin Cancer Res* 2000;6(2):519-525
- 23** Chan G et al. Cyclooxygenase-2 expression is upregulated in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Cancer Res* 1999;59(5):991-994
- 24** Oshima M et al. Suppression of Intestinal Polyposis in APC Knockout Mice by Inhibition of Cyclooxygenase-2 (COX-2). *Cell* 1996 Nov 29;87:803-809
- 25** Liu CH et al. Overexpression of cyclooxygenase-2 is sufficient to induce tumorigenesis in transgenic mice. *J Biol Chem* 2001 May 25;276(21):18563-18569
- 26** Uefuji K et al. Expression of cyclooxygenase-2 in human gastric adenomas and adenocarcinomas. *J Surg Oncol* 2001 Jan;76(1):26-30
- 27** Masunaga R et al. Cyclooxygenase-2 expression correlates with tumor neovascularization and prognosis in human colorectal carcinoma patients. *Clin Cancer Res* 2000;6(10):4064-4068
- 28** Khuri FR Cyclooxygenase-2 overexpression is a marker of poor prognosis in stage I non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res* 2001;7(4):861-867
- 29** Takahashi T et al. Increased expression of COX-2 in the development of human lung cancers. *J Environ Pathol Toxicol Oncol* 2002;21(2):177-181

-
- 30** Tsujii M et al. Alterations in cellular adhesion and apoptosis in epithelial cells overexpressing prostaglandin endoperoxide synthase 2. *Cell* 1995;83(3):493-501
- 31** Uefuji K et al. Cyclooxygenase-2 expression is related to prostaglandin biosynthesis and angiogenesis in human gastric cancer. *Clin Cancer Res* 2000;6(1):135-138
- 32** Rigas B et al. Altered eicosanoid levels in human colon cancer. *J Lab Clin Med.* 1993;122(5):489-490
- 33** Sheng H et al. Modulation of apoptosis and Bcl-2 expression by prostaglandin E2 in human colon cancer cells. *Cancer Res* 1998;58(2):362-366
- 34** Chan TA et al. Mechanisms underlying nonsteroidal anti-inflammatory drug-mediated apoptosis. *Proc Natl Acad Sci, USA* 1998;95:681-686
- 35** Roberts RA et al. Evidence for the suppression of apoptosis by the peroxisome proliferator activated receptor alpha (PPAR alpha). *Carcinogenesis* 1998;19:43-48
- 36** Tsubouchi Y et al. Inhibition of human lung cancer growth by the peroxisome proliferator-activated receptor-gamma agonists through induction of apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun* 2000;270:400-405
- 37** Gupta R et al. Prostacyclin-mediated activation of peroxisome proliferator-activated receptor delta in colorectal cancer. *Proc Natl Acad Sci* 2000;97:13275-13280
- 38** He TC et al. PPARdelta is an APC-regulated target of nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Cell* 1999;99:335-345
- 39** Liu XH et al. NS398, a selective cyclooxygenase-2 inhibitor, induces apoptosis and down-regulates bcl-2 expression in LNCaP cells. *Cancer Res* 1998;58(19):4245-4249
- 40** Hsu A et al. The Cyclooxygenase-2 Inhibitor Celecoxib Induces Apoptosis by Blocking Akt Activation in Human Prostate Cancer Cells Independently of Bcl-2. *J Biol Chem* 2000;275(15):11397-11403
- 41** Cao Y et al. Intracellular unesterified arachidonic acid signals apoptosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000;97:11280-11285
- 42** Scorrano L et al. Arachidonic acid causes cell death through the mitochondrial permeability transition. Implications for tumor necrosis factor-alpha apoptotic signaling. *J Biol Chem* 2001;276:12035-12040
- 43** Steele VE et al. Potential use of lipoxygenase inhibitors for cancer chemoprevention. *Expert Opin Investig Drugs* 2000;9:2121-2138
- 44** Chang HC et al. Cyclooxygenase-2 level and culture conditions influence NS398-induced apoptosis and caspase activation in lung cancer cells. *Oncology Reports* 2001;8:1321-1325

-
- 45** McGinty A et al. Cyclooxygenase-2 expression inhibits trophic withdrawal apoptosis in nerve growth factor-differentiated PC12 cell. *J Biol Chem* 2000;275(16):12095-12101
- 46** Chang YW et al. Cyclooxygenase 2 promotes cell survival by stimulation of dynein light chain expression and inhibition of neuronal nitric oxide synthase activity. *Mol Cell Biol* 2000;20(22):8571-8579
- 47** Gilhooly EM et al. The association between a mutated ras gene and cyclooxygenase-2 expression in human breast cancer cell lines. *Int J Oncol* 1999;15(2):267-270
- 48** Majima M et al. Cyclo-oxygenase-2 enhances basic fibroblast growth factor-induced angiogenesis through induction of vascular endothelial growth factor in rat sponge implants. *Br J Pharmacol* 2000;130(3):641-649
- 49** Tsujii M et al. Cyclooxygenase regulates angiogenesis induced by colon cancer cells. *Cell* 1998;93(5):705-16
- 50** Takaoka Y, Niwa S, Nagai H. Interleukin-1beta induces interleukin-6 production through the production of prostaglandin E(2) in human osteoblasts, MG-63 cells. *J Biochem (Tokyo)* 1999;126(3):553-8
- 51** Nguyen M et al. Receptors and signaling mechanisms required for prostaglandin E2-mediated regulation of mast cell degranulation and IL-6 production. *J Immunol* 2002;169(8):4586-93
- 52** Huang SP et al. Correlation between serum levels of interleukin-6 and vascular endothelial growth factor in gastric carcinoma. *J Gastroenterol Hepatol* 2002 Nov;17(11):1165-9
- 53** Daniel TO et al. Thromboxan A2 is a mediator of cyclooxygenase-2-dependent endothelial migration and angiogenesis. *Cancer Res* 1999;59(18):4574-4577
- 54** Tsujii M et al. Cyclooxygenase-2 expression in human colon cancer cells increases metastatic potential. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997;94(7):3336-40
- 55** Nelson AR et al. Matrix metalloproteinases: biologic activity and clinical implications. *J Clin Oncol* 2000;18:1135-1149
- 56** Kambayashi T et al. Potential involvement of IL-10 in suppressing tumor-associated macrophages. Colon-26-derived prostaglandin E2 inhibits TNF-alpha release via a mechanism involving IL-10. *J Immunol* 1995;154(7):3383-3390
- 57** Eling TE et al. Prostaglandin H synthase and xenobiotic oxidation. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1990;30:1-45
- 58** Elder DJE et al. Apoptosis induction and Cyclooxygenase-2 regulation in human colorectal adenoma and carcinoma cell lines by the Cyclooxygenase-2-selective non-steroidal anti-inflammatory drug NS-398. *Int J Cancer* 2000;86:553-560

-
- 59** Rhonda F et al. Selective Inhibition of Cyclooxygenase-2 Suppresses Growth and Induces Apoptosis in Human Esophageal Adenocarcinoma Cells. *Cancer Res* 2000;60:5767-5772
- 60** Ming Li et al. Induction of Apoptosis by cyclooxygenase-2 inhibitor NS-398 through a cytochrome c-dependent pathway in esophageal cancer cells. *Int J Cancer* 2001;93:218-223
- 61** Hida T et al. Cyclooxygenase-2 Inhibitor Induces Apoptosis and Enhances Cytotoxicity of Various Anticancer Agents in Non-Small Cell Lung Cancer Cell Lines. *Clin Cancer Res* 2000;6:2006-2011
- 62** Uefuji K et al. Induction of apoptosis by JTE-522, a specific cyclooxygenase-2 inhibitor, in human gastric cancer cell lines. *Anticancer Res* 2000;20(6B):4279-4284
- 63** Chan TA. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs, apoptosis, and colon-cancer chemoprevention. *Lancet Oncol* 2002;3:166-173
- 64** Abiru S et al. Aspirin and NS-398 Inhibit Hepatocyte Growth Factor-Induced Invasiveness of Human Hepatoma Cells. *Hepathology* 2002;35:1117-1124
- 65** Williams CS et al. A cyclooxygenase-2 inhibitor (SC-58125) blocks growth of established human colon cancer xenografts. *Neoplasia* 2001;3(5):428-436
- 66** Hida T et al. Non-small cell lung cancer cyclooxygenase activity and proliferation are inhibited by non-steroidal antiinflammatory drugs. *Anticancer Res* 1998;18(2A):775-782
- 67** Bae SH et al. Expression of Cyclooxygenase-2 (COX-2) in Hepatocellular Carcinoma and Growth Inhibition of Hepatoma Cell Lines by a COX-2 Inhibitor, NS-398. *Clin Cancer Res* 2001;7:1410-1418
- 68** Hanif R et al. Effects of nonsteroidal anti-inflammatpry drugs on proliferation and on induction of apoptosis in colon cancer cells by a prostaglandin-independent pathway. *Biochem Pharmacol* 1996;52(2):237-245
- 69** Piazza GA et al. Sulindac sulfone inhibits azoxymethane-induced colon carcinogenesis in rats without reducing prostaglandin levels. *Cancer Res* 1997 Jul 15;57(14):2909-2915
- 70** Tegeder I et al. Cyclooxygenase-independent actions of cyclooxygenase inhibitors. *FASEB J* 2001;15:2057-2072
- 71** Sovak MA et al. Abberant nuclear factor-kappaB/Rel expression and the pathogenesis of breast cancer. *J Clin Invest* 1997;100(12):2952-2960
- 72** Yamamoto Y et al. Sulindac inhibits activation of NFκB pathway. *Biochem Pharmacol* 1999;274(38):27307-27314
- 73** Grilli M et al. Neuroprotection by aspirin and sodium salicylate through blockade of NFκB activation. *Science* 1996;274:1383-1385

-
- 74** Murono S et al. Aspirin inhibits tumor cell invasiveness induced by Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 through suppression of matrix metalloproteinase-9 expression. *Cancer Res* 2000;60:2555-2561
- 75** Yoshizaki T et al. The expression of matrix metalloproteinases 9 is enhanced by Epstein-Barr virus latent membrane protein 1. *Proc Natl Acad Sci* 1998;95:3621-3626
- 76** Stark LA et al. Aspirin-induced activation of the NF- κ B signaling pathway: a novel mechanism for Aspirin-mediated apoptosis in colon cancer cells. *FASEB J.* 2001;7:1273-1275
- 77** Jones R et al. Protein kinase B regulates T lymphocyte survival, nuclear factor kappaB activation, and Bcl-X(L) levels in vivo. *J Exp Med* 2000;191:1721-134
- 78** He TC et al. PPARdelta is an APC-regulated target of nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Cell* 1999;99:335-345
- 79** Su CG et al. A novel therapy for colitis utilizing PPAR- γ ligands to inhibit the epithelial inflammatory response. *J Clin Invest* 1999;104(4):383-389
- 80** Li H et al. Cytochrome c release and apoptosis induced by mitochondrial targeting of nuclear orphan receptor TR3. *Science* 2000;289:1150-1164
- 81** Kang H et al. Transcriptional induction of Nur77 by indomethacin that results in apoptosis of colon cancer cells. *Biol Pharm Bull* 2000;23:815-819
- 82** Jemal A et al. Cancer Statistics, 2002. *CA Cancer J Clin* 2002;52:23-47
- 83** Robert Koch-Institut: Publikation "Entwicklung der Überlebensraten von Krebspatienten in Deutschland" 1999
- 84** Klimp A et al. Expression of Cyclooxygenase-2 and Inducible Nitric Oxide Synthase in Human Ovarian Tumors and Tumor-associated Macrophages. *Cancer Res* 2001 Oct1;61:7305-7309
- 85** Ferrandina G et al. Cyclooxygenase-2 (COX-2), Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR), and Her-2/neu Expression in Ovarian Cancer. *Gynecologic Oncology* 2002;85:305-310
- 86** Fairfield KM et al. Aspirin, other NSAIDs, and ovarian cancer risk (United States). *Cancer Causes Control* 2002 Aug;13(6):535-42
- 87** Cramer DW et al. Over the counter analgesics and risk of ovarian cancer. *Lancet* 1998;351(9096):104-107
- 88** Akhmedkhanov A et al. Aspirin and epithelial ovarian cancer. *Prev Med* 2001;33(6):682-687
- 89** Moysich KB et al. Regular use of analgesic drugs and ovarian cancer risk. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2001;10(8):903-6

-
- 90** Tavani A et al. Aspirin and ovarian cancer: an Italian case-control study. *Ann Oncol* 2000;11(9):1171-3
- 91** Rodriguez-Burford C et al. Effects of Nonsteroidal Anti-inflammatory Agents (NSAIDs) on Ovarian Carcinoma Cell Lines: Preclinical Evaluation of NSAIDs as Chemopreventive Agents. *Clin Cancer Res* 2002;8:202-209
- 92** Cullen BR. RNA interference: antiviral defense and genetic tool. *Nature Immunol* 2002;3(7):597-599
- 93** Elbashir SM et al. Analysis of gene function in somatic mammalian cells using small interfering RNAs. *Methods* 2002;26(2):199-213
- 94** Elbashir SM et al. Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature* 2001;411(6836):494-498
- 95** Carsten Denkert, Antje Fürstenberg, Peter Daniel, Ines Koch, Martin Köbel, Wilko Weichert, Antje Siegert and Steffen Hauptmann. Induction of G0/G1 cell cycle arrest in ovarian carcinoma cells by the anti-inflammatory drug NS-398, but not by COX-2-specific RNA interference. *Oncogene*. 2003 Nov 27;22(54):8653-61
- 96** Nicoletti I et al. A rapid and simple method for measuring thymocyte apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. *J Immunol Meth* 1991;139:271-279
- 97** Sachs L. *Angewandte Statistik* 9.Aufl. Springer-Verlag Berlin Heidelberg 1999:360-363
- 98** Lord E. The use of the range in place of the standard deviation in the t-test. *Biometrika* 1947;34:41-67, Tab.10
- 99** Munkarah AR et al. Effects of Prostaglandin E2 on Proliferation and Apoptosis of Epithelial Ovarian Cancer Cells. *J Soc Gynecol Investig* 2002;9:168-73
- 100** Toyoshima T et al. Inhibitor of cyclooxygenase-2 induces cell-cycle arrest in the epithelial cancer cell line via up-regulation of cyclin dependent kinase inhibitor p21. *Br J Cancer* 2002;86:1150-1156
- 101** Hung WC et al. Induction of p27^{KIP1} as a Mechanism Underlying NS398-Induced Growth Inhibition in Human Lung Cancer Cells. *Mol Pharmacol* 2000;58:1398-1403
- 102** Yip-Schneider M et al. Cell Cycle Effects of Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs and Enhanced Growth Inhibition in Combination with Gemcitabine in Pancreatic Carcinoma Cells. *J Pharmacol Exp Ther* 2001;298(3):976-985
- 103** Subbégowda R and Frommel TO. Aspirin Toxicity for Human Colonic Tumor Cells Results from Necrosis and Is Accompanied by Cell Cycle Arrest. *Cancer Res* 1998;58:2772-2776

-
- 104** Hurwitz A et al. Interleukin-1 is both morphogenic and cytotoxic to cultured ovarian cells: obligatory role for heterologous, contact-independent cell-cell interaction. *Endocrinology* 1992 Oct;131(4):1643-1649
- 105** Rieder J et al. Nitric oxide-dependent apoptosis in ovarian carcinoma cell lines. *Gynecol Oncol* 2001;82(1):172-176
- 106** Verschraegen CF et al. Effects of interleukin-1 alpha on ovarian carcinoma patients with recurrent disease. *Eur J Cancer* Aug1996;32A(9):1609-1611
- 107** Windbichler GH et al. Interferon-gamma in the first-line therapy of ovarian cancer: a randomized phase III trial. *Br J Cancer* 2000;82(6):1138-1144
- 108** Song X et al. Cyclooxygenase-2, Player or Spectator in Cyclooxygenase-2 Inhibitor-Induced Apoptosis in Prostate Cancer Cells. *J National Cancer Institute* 2002;94(8):585-591
- 109** Sherr CJ. *Cancer Cell Cycle*. Science. 1996;274(5293):1672-7
- 110** Smith ML et al. The effect of non-steroidal anti-inflammatory drugs on human colorectal cancer cells: evidence of different mechanism of action. *European Journal of Cancer* 2000;36:664-674
- 111** Moalic-Juge S et al. The anti-apoptotic property of NS-398 at high dose can be mediated in part through NF- κ B activation, hsp70 induction and a decrease in caspase-3 activity in human osteosarcoma cells. *Int J Oncol* 2002;20:1255-1262
- 112** Husain S et al. MAPK (ERK2) kinase – a key target for NSAIDs-induced inhibition of gastric cancer cell proliferation and growth. *Life Sciences* 2001;69:3045-3054
- 113** Trifan OC et al. Overexpression of Cyclooxygenase-2 Induces Cell Cycle Arrest. *J Biol Chem* 1999;274(48):34141-34147
- 114** Zahner G et al. Cyclooxygenase-2 overexpression inhibits platelet-derived growth factor induced mesangial cell proliferation through induction of the tumor suppressor gene p53 and the cyclin-dependent kinase inhibitors p21^{waf-1/cip-1} and p27^{kip-1}. *J Biol Chem* 2002;277(12):9763-9771
- 115** Miwa Y et al. 15-Deoxy-Delta(12,14)-prostaglandin J(2) induces G(1) arrest and differentiation marker expression in vascular smooth muscle cells. *Mol Pharmacol* 2000;58(4):837-844
- 116** Inoue H et al. Feedback control of cyclooxygenase-2 expression through PPARgamma. *J Biol Chem* 2000;275(36):28028-28032

-
- 117** Moalic S et al. Dose-dependent modulation of apoptosis and cyclooxygenase-2 expression in human 1547 osteosarcoma cells by NS-398, a selective cyclooxygenase-2 inhibitor. *Int J Oncol* 2001;18(3):533-540
- 118** Tanaka A et al. Up-regulation of cyclooxygenase-2 by inhibition of cyclooxygenase-1: a key to nonsteroidal anti-inflammatory drug-induced intestinal damage. *J Pharmacol Exp Ther* 2002;300(3):751-761
- 119** Law BK et al. Salicylate-induced Growth Arrest Is Associated with Inhibition of p70^{s6k} and Down-regulation of c-Myc, Cyclin D1, Cyclin A, and Proliferating Cell Nuclear Antigen. *J Biol Chem* 2000;278(49):38261-38267
- 120** Weiss H et al. Inhibition of store-operated Calcium entry contributes to the anti-proliferative effect of Non-steroidal Anti-Inflammatory Drugs in human colon cancer cells. *Int J Cancer* 2001;92:877-882
- 121** Swamy MV et al. Lamin B, caspase-3 activity, and apoptosis induction by a combination of HMG-CoA reductase inhibitor and COX-2 inhibitors: A novel approach in developing effective chemopreventive regimens. *Int J Oncol* 2002;20:753-759
- 122** Pyo H et al. A Selective Cyclooxygenase-2 Inhibitor, NS-398, Enhances the Effect of Radiation in Vitro and in Vivo preferentially on the Cells That Express Cyclooxygenase-2. *Clin Cancer Res* 2001, Oct,7:2998-3005
- 123** Zhang Z et al. Par-4, a proapoptotic gene, is regulated by NSAIDs in human colon carcinoma cells. *Gastroenterology* 2000 Jun;118(6):1012-1017
- 124** Camandola S et al. Pro-apoptotic action of PAR-4 involves inhibition of NF-kappaB activity and suppression of BCL-2 expression. *J Neurosci Res* 2000 Jul 15;61(2):134-139
- 125** Tamatani M et al. Tumor necrosis factor induces BCL-2 and BCL-x expression through NfkappaB activation in primary hippocampal neurons. *J Biol Chem* 1999 Mar;274(13):8531-8538

8 Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides Statt, daß die vorliegende Dissertation von mir selbst und ohne die unzulässige Hilfe Dritter verfaßt wurde, auch in Teilen keine Kopie anderer Arbeiten darstellt und die benutzten Hilfsmittel sowie die Literatur vollständig angegeben sind.

Berlin, den

Antje Fürstenberg

9 Danksagung

Mein herzlicher Dank gilt allen, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Speziell möchte ich mich dafür bei meinen Eltern bedanken
und bei Prof. Dr. Steffen Hauptmann, Dr. Carsten Denkert, PD Dr. Peter Daniel, Ines Koch,
Wolfgang Schmitt, Berit Müller, Dr. Martin Köbel, Dr. Wilko Weichert, Dr. Antje Siegert, Lisa
Glanz, Dr. Bernd Gillissen, Dr. Clarissa von Haefen, Lilian Stärck und Antje Richter.

Ganz besonders danke ich meinen Großeltern und Roland Schaette.